

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAĞLIKLI, HİPERPLAZİK VE ADENOMATÖZ PARATİROİT
DOKULARINDA MİNÖR VE MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE
ANTİJENLERİNİN EKSPRESYON MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

BEYZA SERVET GÖNCÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ

OCAK 2018

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAĞLIKLI, HİPERPLAZİK VE ADENOMATÖZ PARATİROİT
DOKULARINDA MİNÖR VE MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE
ANTİJENLERİNİN EKSPRESYON MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Beyza Servet GÖNCÜ
140506112**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ

OCAK 2018

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 140506112 numaralı Doktora Öğrencisi Beyza Servet GÖNCÜ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "SAĞLIKLI, HİPERPLAZİK VE ADENOMATÖZ PARATİROİT DOKULARINDA MİNÖR VE MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE ANTİJENLERİNİN EKSPRESYON MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. M. Erhan AYŞAN**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. M. Ziya DOYMAZ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Teslim Tarihi : 17 Aralık 2017
Savunma Tarihi : 24 Ocak 2018



gerçekten emek sarf edebilenlere

ÖNSÖZ

Eğitim sürecinde katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nur Özten Kandaş'a ve sayın Prof. Dr. Erhan Ayşan'a, tecrübe ve bilgilerinden her zaman yararlanma olanağı bulduğum Dr. Emrah Yücesan, Doç. Dr. Binnur Temel, Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez izleme jürimdeki Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan ve Prof. Dr. Mehmet Ziya Doymaz hocalarıma destekleri ve ilgileri için teşekkür ederim. 2006 yılından bu yana eğitim hayatımda ayrı yeri olan Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresince Sezen Atasoy ve Önder Hüseyinbaş'a eşsiz dostlukları için, hayatım boyunca yanımda olan aileme ve özellikle kardeşlerim Sadullah ve Muhiddin Göncü'ye, desteğini her zaman hissettiğim Arzu Bahar Erol'a şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması günde 64km yol, 4saat uyku, 10saat mesai yapılarak tamamlanmıştır. Bunları neden yaptığımı unuttuğum günlere selam olsun.

Ocak 2018

Beyza Servet Göncü
(Uzman Moleküler Biyolog)

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.

Beyza Servet GÖNCÜ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	ix
SEMBOLLER.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. PARATİROİT DOKUSU.....	3
1.1.1 Anatomi ve Histoloji.....	3
1.1.2 Fizyoloji.....	4
1.1.3 Parathormon.....	4
1.1.4 Paratiroit Dokusu Hücreleri.....	6
1.1.4.1 Esas Hücreler.....	6
1.1.4.2 Oksifil Hücreler.....	6
1.1.4.3 Waterclear Hücreler.....	8
1.1.5 Paratiroit Dokusunun Görevleri.....	9
1.1.5.1 Kalsiyum Metabolizması.....	9
1.1.5.2 D Vitamini Metabolizması.....	10
1.1.5.3 Fosfor Metabolizması.....	11
1.1.5.4 Magnezyum Metabolizması.....	12
1.1.6 Paratiroit Hastalıkları.....	13
1.1.6.1 Hipoparatiroidi.....	13
1.1.6.2 Hiperparatiroidi.....	13
1.2 MAJÖR ve MİNÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE ANTİJENLERİ.....	15
1.2.1 Majör Histokompatibilite Antijenleri.....	15
1.2.1.1 HLA Sınıf I.....	15
1.2.1.2 HLA Sınıf II.....	18

	<u>Sayfa</u>
1.2.2 Minör Histokompatibilite Antijenleri.....	20
1.2.2.1 SP110.....	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1 Gereçler.....	24
2.2 Yöntem.....	26
2.2.1 Paratiroit hücrelerinin izolasyon ve kültürü.....	26
2.2.2 Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu.....	27
2.2.3 Parathormon ELISA.....	28
2.2.4 Protein Düzeyinde Ekspresyon Belirleme.....	29
2.2.5 Total Protein İzolasyonu.....	30
2.2.5.1 Bradford metoduna göre protein miktar tayini.....	31
2.2.6 Protein Jel Elektroforezi.....	31
2.2.6.1 Kullanılan tamponlar.....	31
2.2.7 mRNA Düzeyinde Ekspresyon Belirleme Çalışmaları.....	34
2.2.7.1 Total RNA izolasyonu.....	35
2.2.7.2 cDNA sentezi.....	35
2.2.7.3 HLA sınıf I ve II mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi...	36
2.2.8 İstatistiksel Analiz.....	37
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
3.1 Bulgular.....	38
3.1.1 Çalışma grupları.....	38
3.1.2 Hücre İzolasyonları.....	38
3.1.3 Parathormon ELISA.....	39
3.1.4 Protein Kantitasyonu.....	41
3.1.5 Total RNA izolasyonları ve cDNA sentezi.....	43
3.1.6 Housekeeping Protein beta-aktin Ekspresyonu.....	44
3.1.7 HLA Sınıf I Antijenlerinin Ekspresyonları.....	45
3.1.8 HLA Sınıf II Antijenlerinin Ekspresyonları.....	47
3.1.8.1 HLA-DR protein ekspresyonları.....	48

	<u>Sayfa</u>
3.1.8.2 HLA-DP protein ekspresyonları.....	49
3.1.8.3 HLA-DQ α 1- HLA-DQ α 2 protein ekspresyonları.....	49
3.1.9 Sağlıklı Paratiroid Dokularının HLA sınıf I-II Gen Ekspresyonları..	50
3.1.10 MiHa SP110 peptit Protein Ekspresyonları.....	51
3.2 Tartışma.....	53
3.2.1 HLA Sınıf I Ekspresyonları Analizi.....	53
3.2.1.1 HLA-A.....	53
3.2.1.2 HLA-B.....	56
3.2.1.3 HLA-C.....	58
3.2.2 Sağlıklı Paratiroid Dokularının HLA-sınıf I gen Ekspresyonları....	58
3.2.3 HLA Sınıf II Ekspresyonları Analizi.....	59
3.2.3.1 HLA-DR.....	59
3.2.3.2 HLA-DP.....	60
3.2.3.3 HLA-DQ.....	61
3.2.4 Sağlıklı Paratiroid Dokularının HLA-sınıf II gen Ekspresyonları....	64
3.2.5 Paratiroid Dokularında SP110 peptit Varlığı.....	64
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	91

KISALTMALAR

1αOase	: 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase
a.a.	: Amino asit
ATRA	: All-trans retinoic acid inducer
bio-iPTH	: bio-intakt parathormon
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
CaSR	: Kalsiyum-algılayıcı reseptör
CLIP	: Sınıf II bağıntılı invariant zincir peptit
DBP	: Vitamin D bağlayıcı protein
ERK1/2	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar
FGF23	: Fibroblast büyüme faktörü 23
GCM2	: Glial cells missing 2
G_i	: İyonotropik G protein reseptörü
GPCR	: G-protein eşlikli reseptör
HLA	: İnsan lökosit antijenleri
IFN	: İnterferon
IOPTH	: İnteroperatif parathormon
iPTH-N	: N-terminal intakt parathormon
KIR	: Doğal öldürücü hücre immünglobülin benzeri reseptör
MiHa	: Minör histokompatibilite antijeni
mRNA	: mesajcı RNA
Nk	: Doğal öldürücü hücre
Npt	: Sodyum-fosfat ko-taşıyıcı kanal
pHPT	: Primer hiperparatiroidi
PI-PLC	: Fosfotidil inositol-spesifik fosfolipaz C
Pin1	: Peptidil-prolil izomeraz 1
Pit-2	: Tip2 fosfat taşıyıcı kanal
PKMH	: Periferik kan mononükleer hücreler
PTH	: Parathormon
PTHR	: Parathormon Reseptörü
PTHrP	: Parathormon-bağımlı protein
sHPT	: Sekonder hiperparatiroidi
SNP	: Tek nükleotid polimorfizm
TAP	: Taşıyıcı antijen işleme kompleksi
TRPM	: Transient reseptör potansiyel kanal metastatin
UTR	: Transle edilemeyen bölge
VDR	: Vitamin D reseptörü

SEMBOLLER

α	: Alfa
μ	: Mikrometre
Da	: Dalton
dk	: Dakika
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: MiliMolar
nm	: Nanometre
sn	: Saniye
β	: Beta

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve markaları.....	24
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları.....	24
Tablo 2.3: HLA Sınıf I ve II'nin araştırılacağı hücre örnek grupları.....	29
Tablo 2.4: MiHa SP110 pepetidinini araştırılacağı hücre örnek grupları.....	30
Tablo 2.5: Jel elektroforezi için kullanılan tamponların içerik ve miktarları.....	31
Tablo 2.6: Transfer aşaması için kullanılan tamponların içerik ve miktarları.....	32
Tablo 2.7: Kullanılan primer/sekonder antikorların final konsantrasyonları.....	34
Tablo 2.8: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı.....	36
Tablo 2.9: HLA genlerine özgül primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.....	36
Tablo 3.1: Paratiroid Hiperplazi ve adenom dokularına ait elde edilmiş hücrelerin total protein konsantrasyonları.....	42
Tablo 3.2: Paratiroid Hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait hücrelerin total RNA saflıkları.....	43
Tablo 4.1 İyi tanımlanmış MiHa peptitleri.....	77

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: SP110 aleli ve reverse order ile işlenmesi.....	23
Şekil 3.1: Dört numaralı paratiroid hiperplazi dokusunun Muse hücre analiz cihazındaki canlılık profili.....	39
Şekil 3.2: İki numaralı paratiroid adenom doku vericisine ait PKMH'lerin Muse hücre analiz cihazındaki canlılık profile.....	39
Şekil 3.3: PTH ELISA standartlarına ait optik dansite değerlerinden oluşturulan standart eğri ve bu standart eğriye ait 3.derece denklem.....	40
Şekil 3.4: Paratiroid hiperplazi dokularının kültürü sonucunda 3, 6, 9 günlerde toplanan süpernatant örneklerine ait PTH değerlerinin değişimi.....	40
Şekil 3.5: Paratiroid adenom dokularının kültürü sonucunda 3, 6, 9 günlerde toplanan süpernatant örneklerine ait PTH değerlerinin değişimi.....	41
Şekil 3.6: Bradford metoduna göre yedi kademeli dilüsyonla gerçekleştirilen optik dansite değerlerine ait standart eğri grafiği ve 3.derece denklem.....	41
Şekil 3.7: Paratiroid adenom örneklerinin housekeeping protein beta-aktin değişim.....	44
Şekil 3.8: Paratiroid hiperplazi örneklerinin housekeeping protein beta-aktin değişimi.....	44
Şekil 3.9: Paratiroid hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait PKMH örneklerinin housekeeping protein beta-aktin değişimi.....	44
Şekil 3.10: Paratiroid hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait housekeeping protein beta-aktin değişimi.....	45
Şekil 3.11: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-A antijeni değişimi.....	46
Şekil 3.12: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-A antijeni değişimi.....	46
Şekil 3.13: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin, kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-B antijeni değişimi.....	46
Şekil 3.14: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-B antijeni değişimi.....	47
Şekil 3.15: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-C antijeni değişimi.....	47

Şekil 3.16:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-C antijeni değişimi.....	47
Şekil 3.17:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DR değişimi.....	48
Şekil 3.18:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DR değişimi.....	48
Şekil 3.19:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DP değişimi.....	49
Şekil 3.20:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DP değişimi.....	49
Şekil 3.21:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 1 antijeni değişimi.....	49
Şekil 3.22:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 1 antijeni değişimi.....	50
Şekil 3.23:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 2 antijeni değişimi.....	50
Şekil 3.24:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 2 antijeni değişimi.....	50
Şekil 3.25:	Paratiroid hiperplazi dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları.....	51
Şekil 3.26:	Paratiroid adenom dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları.....	52
Şekil 3.27:	Sağlıklı paratiroid dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları.....	52
Şekil 3.28:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-A 45kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	54
Şekil 3.29:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-A 45kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	54
Şekil 3.30:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-A 43kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	55
Şekil 3.31:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-A 43kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	55
Şekil 3.32:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6.günlerindeki HLA-A gen ekspresyonunun değişimi.....	56
Şekil 3.33:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-B antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	57
Şekil 3.34:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6.günlerindeki HLA-B gen ekspresyonunun değişimi.....	58
Şekil 3.35:	Paratiroid adenom dokularının sınıf I antijenleri HLA-A ve -B açısından gen ekspresyonunun değişimi.....	58
Şekil 3.36:	Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf I antijenlerinden HLA-A ve -B açısından gen ekspresyonunun değişimi.....	59
Şekil 3.37:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerinde HLA-DR antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	59

Şekil 3.38:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DR antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	60
Şekil 3.39:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6. günlerinde HLA-DR gen ekspresyonunun değişimi.....	60
Şekil 3.40:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DP antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	61
Şekil 3.41:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DP antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	61
Şekil 3.42:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DQ α 1 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	62
Şekil 3.43:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DQ α 1 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	62
Şekil 3.44:	Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DQ α 2 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	62
Şekil 3.45:	Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerinde HLA-DQ α 2 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri.....	63
Şekil 3.46:	Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6. günlerinde HLA-DQ gen ekspresyonunun değişimi.....	63
Şekil 3.47:	Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0,3,6. günlerinde HLA-DQ gen ekspresyonunun değişimi.....	64
Şekil 3.48:	Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf I antijenlerinden HLA-DR ve -DQ antijenlerinin gen ekspresyonunun değişimi.....	64
Şekil 4.1:	Sağlıklı, hiperplazik, adenomatöz paratiroid dokularının HLA-A antijeni gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.2:	Paratiroid hiperplazi dokusunda günlere göre HLA-sınıf I moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim.....	70
Şekil 4.3:	Paratiroid adenom dokusundaki günlere göre HLA-sınıf I moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim.....	70
Şekil 4.4:	Paratiroid hiperplazi dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim.....	74
Şekil 4.5:	Paratiroid hiperplazi dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin gen ekspresyonlarındaki değişim.....	74
Şekil 4.6:	Paratiroid adenom dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim.....	75
Şekil 4.7:	HLA-DR gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.8:	HLA-DQ gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması.....	75

SAĞLIKLI, HİPERPLAZİK VE ADENOMATÖZ PARATİROİT DOKULARINDA MİNÖR VE MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE ANTİJENLERİNİN EKSPRESYON MİKTARLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

İmmün yanıt hakkında öğrenilen her yeni bilgi; dokulara ait karakteristik özelliklerin, immün yanıtı tetikleme, oluşturma ve devamında gerçekleşen süreçlerin önemini işaret etmektedir. Bir dokuya ait spesifik immün yanıtı anlamak için dokunun immünojenitesinin belirlenmesi gerekmektedir. İmmünojenite bir molekülün immün sistemi nasıl teşvik ettiği veya yanıtı meydana getirme yeteneğinin ifadesidir. Dokuya ait immünojenite kavramı, dokuda bulunan veya sunulan Majör ve Minör Histokompatibilite antijenleri ile tanımlanabilir.

İmmünogenetik araştırmalar sonucunda histokompatibilite antijenleri iki grupta incelenmeye başlanmıştır; majör ve minör histokompatibilite antijenleri. İnsan majör histokompatibilite antijenleri, “insan lökosit antijenleri” (HLA) sistemi olarak bilinir. HLA sistemi 6. kromozomun kısa kolunda bir bölgede yerleşmiş olup 200'den fazla gen bölgesini kodlar ve içerdiği gen bölgeleri ile biyoloji ve tıpta çok büyük etkinliklere sahiptir. Temel rolleri organ ve kemik iliği nakillerinde alıcı ve verici arasındaki uyum veya uyumsuzluğun belirlenmesidir.

Edinsel ve doğal bağışıklık arasındaki ilişki, organ nakillerinde ve aynı zamanda paratiroid naklinin sağ kalım süresini etkiler. Allo-tanıma süreci, antijen sunan hücrelerin peptit/insan lökosit antijen (HLA) kompleksi ile aktive olur ve T lenfositlerinin bulunduğu lenf nodüllerine yönelmesi ile başlar. Alıcının, antijen sunan hücresinin donöre ait dokuyu tanınmasıyla, T lenfositleri aktivasyonu ve migrasyonu rejeksiyonu indükler. Paratiroid nakillerinde, kültüre edilen dokular doku-spesifik lökositten yoksun olarak sayılır ve bu yolla greft sağ kalımının artması hedeflenmektedir.

Paratiroid dokusunun immünojenik özelliklerinin HLA molekülleri açısından iyi taranması hedefiyle sınıf I; HLA-A, HLA-B, HLA-C ve sınıf II; HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ α 1, HLA-DQ α 2 bölgelerinin detaylı şekilde hem protein hem gen ekspresyonları, kültüre edilen paratiroid dokularında araştırılmıştır. Ayrıca, otozomal geçişli minör histokompatibilite SP110 peptidinin varlığı, sağlıklı, hiperplazik ve adenomatöz paratiroid dokularında araştırılmıştır.

Sonuç olarak, HLA-A protein ekspresyonu kültür süresince değişmediği fakat mRNA ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. HLA-B protein ve mRNA ekspresyonu yalnızca hiperplazik paratiroid dokularında azalmıştır. HLA-C ise protein ekspresyonu açısından zayıf veya belirlenememiştir. Ayrıca HLA-DQ α 2 ve –DR protein ekspresyonları paratiroid hiperplazi ve adenomatöz dokularda yüksek bulunmuştur. Bu sebeple, paratiroid dokuları HLA sınıf II- bağımlı immün yanıt açısından kültüre edilmelerine rağmen potansiyel birer hedef olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte SP110 peptidinin protein ekspresyonları sağlıklı, hiperplazik ve adenomatöz dokularında sırasıyla belirlenememiş veya orta seviyede pozitif ekspresyon göstermiştir.

Diğer araştırılan veriler HLA-DQ ve –DR arasındaki uyumlu ekspresyon sonuçları, paratiroid dokusunun naklinde rejeksiyon/kısa süreli sağkalıma muhtemel bir bağlantı olduğunu ifade ettiği düşünülmektedir. mRNA ve protein

ekspresyonlarındaki farklı sonuçların HLA sınıf I-II moleküllerinin gen ve protein seviyesindeki farklı kontrol edilme süreçlerinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Proteinlerin biyokimyasal işleme süreçleri, mRNA ile üretilen protein ekspresyonlarının paratiroid dokularında değişiklik göstermektedir. Nakil öncesinde, paratiroid dokularının HLA sınıf I ve II moleküllerinin ekspresyonları açısından değerlendirilmelidir. Yapılan diğer çalışmalar otozomal geçişli minör histokompatibilite antijeni SP110 peptidinin HLA-A*03 aleli taşıyan bireylerin dokusuna karşı spesifik olarak makrofajları uyararak immün sistemi aktive ettiği bilinmektedir. Gelecek çalışmalarda SP110 peptidinin paratiroid dokusundaki pozitifliği makrofaj aktivasyonu açısından *in vitro* olarak değerlendirilmelidir.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (3.2016/7).



COMPARISON OF THE EXPRESSION PATTERNS OF MINOR AND MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS IN HEALTHY, HYPERPLASIC AND ADENOMATOUS PARATHYROID TISSUES

SUMMARY

As we learn more about how immune response occurs, it is becoming clear that the characteristics of the tissue can be important as immune cells determines the initiation and progression of an immune response. A formal definition of immunogenicity can be stated as “the ability of a molecule to provoke an immune response or the strength of an immune response”. Tissue-specific immunogenicity can be characterized by the determination of Major Histocompatibility Complex and Minor Histocompatibility Antigens as well.

The immunogenetic studies of histocompatibility antigens categorized into two groups; major and minor histocompatibility antigens. Human major histocompatibility antigens are known as "human leukocyte antigen" system. The human leukocyte antigen complex is located within the short arm of human chromosome 6 and contains more than 200 genes, has important activities in biology and medicine with the gene regions of diverse function. The major role in medicine is the donor selection in organ and stem cell transplantation.

The coordination between innate and adaptive immunity eliminates the survival of organ transplantations as well as parathyroid transplantations. In allorecognition, antigen presenting cells activated by peptide/human leukocyte antigen (HLA) complex and thus changing its course through lymph nodes where T cells reside. Once the recipient antigen presenting cells recognize donor tissue, this leads to activation and migration of T cells where they promote rejection. In solid organ transplantation, cultured tissue cells were presumed as passenger-leukocyte free which ensures prolonged graft survival.

With the aim of understanding and characterization of parathyroid gland immunogenicity; the both protein and gene expression patterns of major histocompatibility antigens class I; HLA-A, HLA-B, HLA-C and class II; HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ α 1, HLA-DQ α 2 regions were compared in cultured parathyroid cells that derived from healthy, hyperplastic and adenomatous parathyroid tissues. In addition, autosomal restricted minor histocompatibility antigen SP110 protein expression investigated healthy, hyperplastic and adenomatous parathyroid tissues.

As a result, HLA-A protein expression remained the same during culture but mRNA expression decreased. HLA-B protein and mRNA expression decreased only in hyperplasia tissues. HLA-C showed weak/no protein expression for both tissues. In addition, cultured parathyroid tissues are still potential targets for class II-restricted allorecognition even during the culture. Therefore, -DQ α 2 and -DR protein expression was found higher. Besides, parathyroid tissues showed SP110 peptide expression level as follows not detected or moderate in healthy, hyperplastic and adenomatous parathyroid tissues respectively.

In conclusion, HLA class I expression patterns was different at every stage. The change in mRNA levels and protein levels was not correlated in different parathyroid tissues and even during culture. Another outcome that the concordance between HLA-DQ and -DR indicates a possible linkage in rejection/poor graft survival of parathyroid tissue transplantation via allorecognition. This mainly due to

the regulation control at different levels between gene and its protein as well. The biochemical diversity of proteins means that the individual correlation levels with the associated mRNA varies in parathyroid tissues. Parathyroid tissue should be evaluated in detail with this expression patterns of HLA class I and II for allorecognition prior to transplantation. Current studies showed autosomal restricted minor histocompatibility antigen SP110 peptide was found to recognize HLA-A*03 allele and significantly induces macrophage activation. In future studies, SP110 positivity of parathyroid tissues evaluates for macrophage activation via *in vitro* cell culture system.

Presented work was financially supported by Bezmialem Vakif University Scientific Research Funding Unit (3.2016/7).



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün yanıt hakkında öğrenilen her yeni bilgi; dokulara ait karakteristik özelliklerin, immün yanıtı tetikleme, oluşturma ve devamında gerçekleşen süreçlerin önemini işaret etmektedir. Bir dokuya ait spesifik immün yanıtı anlamak için dokunun immünojenitesinin belirlenmesi gerekmektedir. İmmünojenite bir molekülün immün sistemi nasıl teşvik ettiği ve/veya yanıtı meydana getirme yeteneğinin ifadesidir. Dokuya ait immünojenite kavramı, dokuda bulunan veya sunulan Majör ve Minör Histokompatibilite antijenleri ile tanımlanabilir.

Endokrin dokuların %50'sinin immünojenik olmayan dokudan oluştuğu bildirilmiştir [1, 2]. Paratiroid endokrin dokularının HLA sınıf I ve sınıf II antijenleri için değişken ekspresyonlara sahip olduğu ve transplantasyon reddinde görevli olmadığı düşünülen HLA-sınıf I'i düşük miktarda eksprese ettiği (HLA-A, -B, -C), aynı şekilde sınıf II antijenlerinden HLA-DP'nin ekspresyonlarının değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir [3-6]. Devam eden çalışmalarda paratiroid dokuları, dokuya yerleşik immün hücrelerden (makrofaj, lenfosit ve endotel hücreler gibi) ayrılması için enzimatik yöntemlerle izolasyona tabii tutularak 4-6 haftaya kadar kültüre edilmiş ve sınıf I ve II antijen ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir [1, 5]. Bu antijenler açısından ekspresyonların azaldığı hücreler, transplantasyonda kullanılmış ve 2017 verilerine göre nakil yapılan bireylerin %55,1'i 2 ay, %34,5'i 6 ay, %10,2'si 12 ay, %6,2'si 24 ay'a kadar sürvi göstermiştir [2].

Paratiroid endokrin dokular minör histokompatibilite antijenleri (MiHa) açısından daha önce taranmamıştır. Literatürde bu konuda “*proteinatlas*” veritabanı incelendiğinde, sağlıklı ve adenomatöz paratiroid dokularının tanımlanmış MiHa'lar açısından taranmadığı veya kesinliği henüz doğrulanmamış ekspresyonları bildirilmiştir. Paratiroid bezinin embriyolojisinde; alt paratiroid bezleri timüs ile beraber 3. brankiyal keseden köken alır. SP110 peptidi ise lenfoid orijinli bir MiHa peptidi olup, 2016 yılında yapılan bir çalışmada HLA-A antijenine spesifik olarak üretildiği [7] ve *Equus caballus* lökositlerinde makrofaj aktivasyonu gösterdiği iletilmiştir [8].

Çalışmanın hipotezi; kültüre edilen paratiroid dokularındaki, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ α 1, HLA-DQ α 2 ekspresyonlarının, kültüre edilen paratiroid hücrelerindeki değişiminin protein ve gen seviyesinde karşılaştırılması

hedeflenmiştir. Bu karşılaştırma sonrası, transplantasyon için verimli kültür zamanının belirlenmesi, nakil sağkalımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca; MiHa açısından hiperplazik, adenomatöz ve sağlıklı paratiroid doku vericileri, periferik kan mononükleer hücreleri ile taranması SP110 peptit taşıyan bireylerin paratiroid dokularındaki varlığı, sağlıklı paratiroid dokuları ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. SP110 peptit izoformlarının dokularda tanımlanması sayesinde paratiroid transplantasyon etkinliklerinin incelenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



1.1 PARATİROİT DOKUSU

1.1.1 Anatomi ve Histoloji

Robert Remak ve Ivar V. Sanström 1865-1881 yılları arasında bu dokuları anatomik olarak buldukları yer açısından "paratiroit" olarak isimlendirmiş ve insanlarda 4 diğer memelilerde ise 2 adet olduğunu gözlemlemişlerdir [9, 10]. 1907'de Haslsted ve Evans tiroit cerrahisinde paratiroit dokularının korunması konusuna dikkat çekmişlerdir [11]. Paratiroit dokularının nasıl kanlandığı ve beslendikleri ise 1982 yılında Flament ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [12]. Çeşitli sayı, lokalizasyon ve yapıya sahip olabilen paratiroit dokuları için otopsi çalışmaları mevcuttur. Akerström ve arkadaşları, 1986'da 422 otopsi dokusuna ait histolojik yapının çalışıldığı seride sağlıklı paratiroit dokularının hücresel anlamda eş dağılım gösterdiğini, dokuların %7'sinde hiperplazi ve %2,4'ünde adenomatöz yapı olduğunu gözlemlemiştir [13]. Wang, yaptığı 160 otopsi serisinde; %1,9 oranında 5 ayrı paratiroit bezi ve %0,6 oranında 6 ayrı paratiroit bezi tespit etmiştir [14]. Akerström ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer otopsi serisinde 503 olguda dokuların anatomik düzeni değerlendirilmiş ve sayıları değerlendirilmiş olup; serinin %3'ünde 3'er adet, %84'ünde 4'er ve %13'ünde 4'ten fazla paratiroit bezi olduğu görülmüştür. Paratiroit bezlerinin sayıca 4'ten az olduğu durumları, "lokalize edilememe", 4'ten fazla olduğu durumları ise "aksesuar (*supernumary*) paratiroit" olarak tanımlamışlardır [15].

Paratiroit bezinin dıştan çevreleyen fibrötik ince bir kapsülle ayrılmış vasküler yapısında, iç kısımlara doğru dağılan ince fibröz bantlar mevcuttur ve bu fibröz yapılar kan damarları, lenfatikler ve sinirler ile dokunun beslenmesini sağlamaktadır [12, 16]. Makroskopik görünümleri değerlendirildiğinde; renk değişimi; dokunun taşıdığı yağ miktarına, hücre tipi-sayısına ve kanlanma durumuna göre değişkenlik gösterebildiği bildirilmiştir [16, 17].

1.1.2 Fizyoloji

İnsan vücudunda yaklaşık 1000gr kalsiyum bulunmaktadır. Vücutta bulunan kalsiyumun %99'u kemiklerde depolanmıştır ve %1'i kemik dışında bulunur. Hücre içi ve hücre dışı alandaki kalsiyumun %50'si iyonize halde (fizyolojik olarak aktif rol alan kısım), %40'ı ise proteinlere, %10'u ise fosfat, karbonat, gibi anyonik maddelere bağlı olarak bulunmaktadır. Kandaki kalsiyum seviyesi, parathormon (PTH) ve D vitamininin kemik, böbrek ve ince barsaklar üzerindeki etkisiyle normal sınırlar içinde tutulur [18, 19]. Serbest kalsiyum seviyesi düştüğünde kalsiyum-algılayıcı reseptör (CaSR) aktivitesi düşer ve PTH salınımı artar. PTH'nın salınımı ile kemiklerdeki osteoklastlar uyarılır ve kemik rezorpsiyonu ile açığa çıkan kalsiyum kana geçer. PTH aynı zamanda osteoblastları da uyarak olgunlaşmamış kemik hücrelerinin aktive olmasını ve kemiklerin yenilenmesini indükler. Kandaki serbest kalsiyum miktarı arttığında ise CaSR aktivitesi artar ve PTH salgılanması azaltılır [20]. PTH aynı zamanda böbreklerdeki parathormon reseptörlerini (PTHrP) uyarak fosforun böbreklerden süzülerek atılmasını sağlar. PTH'nın bir diğer etkinliği D vitamini metabolizmasını düzenlemektir [19].

1.1.3 Parathormon

PTH geni; 11. kromozomda bulunur, 3 ekzon taşır; ekzon-I 5'-transle edilmeyen bölge (UTR), ekzon II pre-pro-PTH mRNA'sını ve ekzon III PTH mRNA'sının üç boyutlu yapısını destekleyen 3'-UTR bölgesidir. Ekzon III aynı zamanda PTH mRNA'sının stabil kalmasında etkindir. Bu stabilite etkinliği kalsiyum ve fosforun metabolizmasında yüksek önem taşır [21, 22]. PTH; 9500 Da ağırlıklı, 84 aminoasitten (a.a) oluşan düz zincirli bir polipeptittir [21]. Bu hormonun ilk 25. a.a.'lik kısmı zincirin sinyal peptidini ve 51.-69.'a.a.'ler arasındaki kısım ise reseptörlere bağlanma bölgesini ifade eder (Uniprot ID:P01270). PTH üretiminde ilk olarak ribozomlarda 115 a.a.'lik kısım olan pre-pro-PTH ilk mRNA'dan sentezlenir. Endoplazmik retikulumla geçebilmesi için bu zincirin 25 a.a.'lik kısmı amino terminal uçtan kesilir ve pro-PTH oluşur. Endoplazmik retikulumdan salınmadan önce N-terminal ucundan 6 a.a.'lik kısmında enzimatik yolla kesilmesini takiben kalan 84 a.a.'lik PTH proteininin üretimi tamamlanmış olur. Salgı vezikülleri olarak paketlenen PTH plazma membranına taşınır [21, 23]. PTH mRNA'sı ile proteinlerin etkileşimi peptidil-prolil izomeraz 1 (Pin1) enzimiyle düzenlenmektedir. Kandaki

kalsiyum seviyesinin düşmesiyle Pin1 aktive olur ve birçok proteini aktive ederek mRNA'nın translasyonunu düzenler. Kalsiyum miktarı normale döndükten sonra Pin1 inaktive olur. Pin1'in tüm bu süreçte sorumlu olduğu 26 nükleotitlik cis-elementleri sıçan, fare, at, maymun, köpek, kedi ve insanda tanımlanmış olup, evrimsel olarak korunmuş bir bölge olduğu belirtilmiştir [22, 23].

PTH'nın yarılanma ömrünün hesaplanması için birçok çalışma yapılmıştır. 1998'de Maier ve arkadaşları intra-operatif PTH (IOPTH) ölçümü için sub-total paratiriodektomi yapılan 12 hastanın dokularını kullanmış ve dokuların ameliyattan çıkarılmasını takiben 2,5 dakikalık bekleme süresi sonrasında IOPTH ölçümü (1-84 a.a.'lik bölgeyi bağlayarak ölçüm yapan sistem ile) yaparak PTH'nın yarılanma ömrünün 3 dakika 24 saniye olduğunu hesaplamışlardır [24]. 1999'da Libutti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sub-total paratiriodektomi yapılan, 45 hastada dokuların çıkarılmasını takiben 15 dakika bekleme sonrası alınan kan örnekleri ile IOPTH ölçümü yapılmış, yarılanma ömrünün 5 dakika olduğu belirtilmiştir [25]. 2002'de Bieglmayer ve arkadaşları, sub-total paratiriodektomi yapılan 20 hastada dokuların çıkarılmasını takiben 25 dakika bekleme süresi sonrası alınan kan örneklerinde IOPTH ölçümü yapmış ve bu ölçüm sonuçlarını iki ayrı kinetik model [26] kullanarak yarılanma ömrünü hesaplamışlardır. İki ayrı kinetik modele göre bir farklılık görülmemiş ve yarılanma ömrünün 4 dakika 3 saniye ($\pm 1,6$ dakika) olarak ifade etmişlerdir [27]. 2006'da yine Bieglmayer ve ekibinin yaptığı diğer bir çalışma da sub-total paratiriodektomi yapılan 35 hastada dokuların çıkarılmasını takiben 10 dakika bekleme sonrası alınan kan örnekleri 3 ayrı PTH ölçüm tekniği ile birlikte değerlendirilmiş. Yarılanma ömrü Levenberg-Marquardt algoritması [26] ile hesaplanmıştır. Kullanılan IOPTH ölçüm tipleri; iPTH-R 7-84 a.a.'lik, N-terminal intakt PTH (iPTH-N) 39-84 a.a.'lik ve bio-intakt parathormon (bio-iPTH) 1-84 a.a.'lik bölgeden ölçüm sonuçları bildirmiştir. IOPTH ölçüm sonuçları açısından iPTH-N yani 39-84 a.a.'lik bölgeyi kullanarak ölçüm sonucu veren sistemin daha efektif, ekonomik ve hızlı olduğu ve PTH yarılanma ömrünün ise 3 dakika 42 saniye olduğunu hesaplamışlardır [28]. Yarılanma ömrü hesaplamalarında yapılan en geniş seri 2013 yılında Leiker ve arkadaşlarının yaptığı sub-total paratiriodektomi yapılan 306 hasta verilerine aittir. Yarılanma ömrü hesaplamalarında yaş, cinsiyet, ırk, vucüt kitle endeksi ve böbrek fonksiyon özellikleri ile PTH ölçümleri değerlendirilmiştir. Ameliyat süresinde dokuların çıkarılmasını takiben 5, 10, 15 dakikalık bekleme

süreleri sonrasında ölçülen IOPTH değerlerini takiben Duquenne'nin multikompartmantal modellemesi [29] ve Levenberg-Marquardt algoritması [26] ile PTH'nın yarılanma ömrünün 3 dakika 28 saniye olduğunu hesaplamıştır [30].

1.1.4 Paratiroid Dokusu Hücreleri

Paratiroid dokusu üç tip hücre taşımaktadır; esas hücreler (chief-cells), oksifil hücreler ve waterclear hücreler [31].

1.1.4.1 Esas Hücreler (chief-cells)

Paratiroid dokusunun hücrel olarak baskın özellikli grubunu oluşturan esas hücreler 1942'de Baker tarafından tanımlanmıştır. Baker'ın 1942 yılında notlarında bahsettiği koyu “esas hücreler”inin [32] belirgin sitoplazmik yapıları olduğunu iletmiştir. Çubuk şeklindeki mitokondrileri sitoplazma boyunca homojen dağılım gösterir [16]. Esas hücreler hücre-içi yağ açısından zengindir. İnce bir bağ dokusu tarafından desteklenirler ve buna bağlı olarak kapillerlere yakın yerleşim gösterirler [33]. Esas hücrelerin çekirdekleri birden fazla olabilmekle beraber, nükleer matriks yapıları yoğun bir şekilde düzenlenmiştir [34]. Hücre çaplarının elektron mikroskop görüntülerine göre 0,2 μ genişliğinde oldukları bildirilmiştir [35, 36]. Esas hücrelere ait golgi cisimciğinin agranüler membran yapısı 1957'den sonra görüntülenmiştir [37]. Bu hücrelerin en belirgin özellikleri çok sayıda salgı vezikülü içermeleridir. Membranla kaplı bu veziküller PTH içerirler [38]. Esas hücreler, kalsiyum homeostazisinde önemli rol oynarlar. Yüzeyinde bulunan CaSR sayesinde kandaki kalsiyumu dengelemek için hücre-dışı kalsiyum miktarını algılayıp uygun miktarda PTH salınımını sağlarlar [31].

1.1.4.2 Oksifil Hücreler

Oksifil hücreler; düzgün sınırlı, eozinofilik sitoplazmalı ve piknotik nükleuslu hücrelerdir [16, 17, 31]. 1952-53 yıllarında Parade'nin maymun, at ve insan paratiroid dokularını karşılaştırdığı çalışmaya ilişkin notlarında; oksifil hücrelerin mitokondri büyüklüklerinin ve sayılarının türler arasında değişkenlik gösterdiğini ve insan oksifil hücrelerinde mitokondri sayısındaki değişkenliğin yaş ile de ilişkili olduğunu belirtmiştir [31, 35, 36]. 1958'de Trier; oksifilik hücrelerin bazılarının “koyu” bazılarının ise “soluk” boyandığını gözlemlemiştir. Soluk-boyanan oksifil hücreleri

mitokondriyal içeriklerinin “az”, koyu-boyanan oksifil hücreleri ise mitokondriyal içeriklerinin “fazla” oluşu ile tanımlamıştır [16].

1981’de Allen ve Thorburn 114 sekonder hiperparatiroidi (sHPT) hastasına ait anormal paratiroid dokusunda oksifil hücrelerin etkinliğini incelemiştir. Histolojik değerlendirmenin klinik ile ilişkilendirildiği bu retrospektif çalışmada insan paratiroid dokularında, oksifil hücrelerin yokluğu, varlığı ve sayısı değerlendirilmiştir. Olguların %55’inde birden fazla paratiroid dokusunda ise hiperparatiroidi görüldüğünü, %69’unda 4 paratiroid bezinden birinde adenom bulunduğunu bildirmiştir. Ayrıca olguların %91’inde oksifil hücrelerin bulunduğunu ve oksifil hücre sayısının serum kalsiyum seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini iletmiştir [39].

1990 yılında Suzuki ve arkadaşları, hemodiyaliz alan hastalara ait 148 paratiroid dokusunda yaptığı oksifil hücre fonksiyonu araştırmasında ise; oksifil hücrelerin morfometrik ölçümlerle kapladığı alanı, toplam paratiroid kesit alanına (oksifil hücre alanı/toplam alan) oranlayarak her doku için bir hesaplama yapmıştır. Oksifil hücre alanı/toplam doku alanı oranlarının değerlendirdiği hesaplamalar sonucunda; serum PTH değerlerinin yaş ve diyaliz alım süresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki taşımadığı fakat toplam doku büyüklüğünün PTH salınımı ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak; kronik böbrek yetmezliği çeken hastalarda PTH salınım değerlerinde oksifil hücrelerin etkin olmadığını belirtmiştir [40].

1996’da Tanaka ve arkadaşları, başka bir çalışmada; oksifil hücre fonksiyonunun anlaşılması için 22 sHPT dokusu kullanmıştır. Bu dokulardan 10’unda oksifil hücre bulunduğu ve bu hücrelerdeki PTH mRNA’sının yüksek miktarda olduğunu bildirmiştir. Farelerde heterotransplantasyon yaparak oksifil hücre fonksiyon kontrolü için serumdaki insan PTH miktarı ölçülmüş ve hormon miktarındaki değişimin hücre sayısı-tipi ile değil nakledilmiş doku büyüklüğü ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir [41].

Yapılan çalışmalara rağmen oksifil hücrelerin tam fonksiyonu hakkında kesin bilgi bulunmamaktadır fakat bu konu 2012 yılında Ritter ve arkadaşları tarafından çeşitli çalışmalar [31, 42-44] ile birçok yönden aydınlatılmıştır. Histolojik olarak eozinofilik içeriğin esas hücreden oksifil hücreye doğru artışı; oksifil hücrelerin “geçişle” esas hücrelerden oluştuğunu düşündürmektedir. Bu duruma kanıt olarak,

oksifil hücrelerin, PTH [41] ve paratiroid dokusu gelişiminde rol sahibi olan *glial cells missing 2* (GCM2) paratiroid-spesifik transkripsiyon faktörü [45] eksprese etmesi gösterilmiştir. Oksifil hücrelerin kronik böbrek yetmezliği hastalarında sayıca fazla olduğu ve tedavi görmeyen kişilerin dokularına göre oksifil hücre miktarının çok daha fazla olduğu gözlenmiştir [46, 47]. Oksifil hücrelerin, parathormon-bağımlı protein (PTHrP) eksprese ettikleri [48, 49] ve bu proteinin PTH üretim-salınımında görevli olduğu [41] gösterilse de PTH salınım miktar/salınım mekanizması henüz bilinmemektedir [31].

Oksifil hücrelerinin CaSR ekspresyon miktarı diğer paratiroid hücrelerine göre istatistiksel olarak daha yüksektir. Vitamin D Reseptörü (VDR) açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir [31, 42]. Oksifil hücrelerin yüksek mitokondri içeriği, enerji ihtiyaçlarının diğer paratiroid hücrelerinden fazla olduğuna işaret etmektedir. Mitokondri VDR metabolizmasının gerçekleşmesinden de sorumludur. Ritter'ın bir çalışmasında [44] D vitamininin inaktif formu olan 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (1 α OHase)'ı yüksek miktarda eksprese ettiğini göstermişlerdir. İnsan paratiroid dokusunda 1 α OHase'in miktarının, yüksek kalsiyum ile doğru orantılı olduğunu bildirmiştir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kalsimimetik tedavisinin, oksifil hücrelerdeki 1 α OHase miktarında anlamlı artışa neden olduğunu iletmiştir [43].

1.1.4.3 Waterclear Hücreler

Waterclear hücreleri; sitoplazmalarında çok sayıda glikojen granülleri içerir ve nadiren görülürler. Bu hücrelere klinik anlamda sHPT ve primer hiperparatiroidi (pHPT) hastalarının dokularında rastlanır [50]. 1992'de Emura'nın tavşan paratiroid dokusunda yaptığı çalışma, elektron mikroskobu ile gözlemedikleri paratiroid dokusunda waterclear hücrelerin fazla sayıda vakuol içerdiğini ve esas hücrelerle dağınık şekilde bulunduğunu belirtmiştir. Perivasküler boşluk ile bazal lamina arasında uzanan waterclear hücrelerin ise esas hücrelerle dezmozomal bağlantıları gözlemlenmiştir [51]. 2013 yılında Ezzat ve arkadaşları bir çalışmada, PTH salınımı ve serum kalsiyum seviyelerindeki değişimle bu hücrelerin ilişkisi olmadığını göstermiş ve pHPT olgularının yalnızca % 0,3'ünde bu hücrelere bağlı olarak “*waterclear hücre hiperplazisi*” veya “*waterclear hücre adenomatözü*” görüldüğünü bildirmiştir [52].

1.1.5 Paratiroit Dokusunun Görevleri

1.1.5.1 Kalsiyum Metabolizması

CaSR, G protein aracılı sinyal iletimi ile çalışmaktadır. G protein aracılı reseptörler (GPCR), memelilerdeki tüm hücrelerde protein aracılı sinyal iletiminde görev alır ve aktivasyonun başlatıldığı a.a.'e göre isimlendirilen yolakla ifade edilir [53]. CaSR'nin yapı ve fonksiyonunun anlaşılmasıyla kalsiyum ve PTH miktarı arasındaki ters ilişki ortaya çıkarılmıştır [54]. 2000 yılında Conigrave ve arkadaşları bir çalışmada kalsiyumun set noktasının 1,1-1,2 μM olduğunu ve hücre-dışı kalsiyum miktarının bu değerin altına düşmesiyle birlikte PTH salınımında 2-4 kat artış olduğunu göstermiştir [55].

PTH salınımı iki ayrı yolakla sağlanabilmektedir. Hücre-dışı kalsiyum sensör varlığı; CaSR'nin iyonotropik G reseptör proteini (Gi) yoluyla siklik adenozin monofosfat (cAMP) sentezini aktive ederek, cAMP-bağımlı PTH salınımını düzenler. Bu yolla gerçekleşen PTH salınımı "indüklenen PTH salınım yolağı" olarak ifade edilir [56]. 1986'da Fitzpatrick ve arkadaşları, kalsiyum kanallarının indirekt yollarla fosfotidil inositol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC), sinyal düzenleyici kinazlar $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) ile PTH salınımını düzenlediğini göstermiştir. Bu yolla gerçekleşen salınım ise "spontan PTH salınım yolağı" olarak ifade edilmektedir [56-58]. Spontan PTH salınım yolağının başka iyonlarla olan etkileşimi; 1989'da Chen [59] ve 1990'da Brown [60]'ın çalışmalarıyla gösterilmiştir. Sığır paratiroit hücrelerinde inorganik divalent katyon olan magnezyum ve stronsiyumun inositol fosfat miktarını arttırdığı gösterilmiştir [56]. CaSR'nin spontan uyarılmasını sağlayan PI-PLC yolağını; trivalent inorganik katyonlardan Lantanit (La^{3+}), Gadolinyum (Gd^{3+}) [82] ve Terbiyum (Tb^{3+})'un aktive ettiği fakat cAMP-bağımlı PTH salınımını baskıladığı gösterilmiştir [56, 60, 61]. CaSR'nin pozitif veya negatif modülasyonuna etki eden divalent, trivalent, polivalent iyonlar ve L-a.a.'ler, PI-PLC inhibitörlerinin mekanizmaları aydınlatıldıkça tedavi için geliştirilecek ilaçların yapı, özellik, etkinlik ve spesifitelerinin belirlemesine katkı sağlamıştır [62].

Vücutta günlük beslenme ile alınan kalsiyumun %20'si gastrointestinal sistem tarafından emilmektedir. Kalsiyum vücutta özellikle duodenum, jejunum ve ileum kısımlarından emilir. İntestinal sistemdeki bu segmentlerin kalsiyum için yüksek emilim özellikleri vardır [19, 63]. İntestinal epitel yüzeylerde emilim için 2 yol

vardır; parasellüler (hücreler arasında gerçekleşir) ve transsellüler yol (hücre içerisinden geçerek gerçekleşir). Parasellüler yol pasif olarak gerçekleşir. Kalsiyum iyonu arttıkça geçiş devam eder. Parasellüler yolak indirekt olarak kalsitrol varlığında, hücreler arası sıkı bağlantıların (*zonula ocludens*) daha geçirgen olmasını sağlar ve kalsiyum iyon geçişini kolaylaştırır.

Transsellüler yolakta konsantrasyon gradiyentine bağlı olarak geçiş gösteren kalsiyum, hızlı şekilde kalmoduline bağlanır. Kalmodulin-kalsiyum kompleksleri doygun hale ulaşır. Gradyent değişimi ile kalsiyum geçisi yavaşlar. Intestinal epitel hücreler, gradientteki azalmaya bağlı olarak kalbindin sentezler. Kalmodulin-kalsiyum kompleksleri ayrılır ve kalsiyum serbest kalır. Bu şekilde sodyum-kalsiyum değişim kanallarından, hücre-içi kalsiyum dışarı çıkarılır [19, 64].

Böbrekte kalsiyum düzenlenmesi; kalın çıkan kol kısmında %20 oranında kalsiyum emilimi gerçekleşir. Henle kulpunun kalın çıkan kol kısmındaki emilim hem parasellüler hem de transsellüler yolla gerçekleşmektedir [65]. Henle kulpunun inen ince kol kısmında ise kalsiyum emilimi yoktur. Böbrekteki distal kıvrımlı tübülde transsellüler yol ile filtre edilen kalsiyumun %5-10 kadarı geri emilir. Proksimal kıvrımlı tübül parasellüler yol ile su, sodyum ve kalsiyum geri emilimin de görevlidir [19].

1.1.5.2 D Vitamini Metabolizması

D Vitamini; güneş ışınlarının 7-dehidrokolesterol'ü pre-vitamin D3'e, daha sonra termal izomerizasyon ile vitamin D3'e çevirmesi sonucu oluşur [66]. D3 vitamini yağ hücrelerinde depolanır ve gerektiğinde bu hücrelerden salınımı gerçekleşir [67]. Dolaşımda bulunan D vitamini her zaman vitamin-D bağlayıcı protein (DBP) ile bağlı haldedir. D vitamininin aktive olması için 2 hidroksilasyon aşaması mevcuttur. İlk aşama karaciğerde; D vitamininin 25.karbonu sitokrom P450 tarafından hidroksilasyona uğrar ve 25(OH)-D oluşur. CYP2R1 ve CYP27A1 gibi birkaç sitokrom P450 enzimi ile 25.karbondan hidroksilasyon devam eder. DBP ile böbreklere taşınan DBP-25(OH)-D kompleksi, glomerulustan filtre edilerek, ikinci hidroksilasyon süreci başlar. CYP27B1 enzimi ile birçok reseptör aracılı geri-alınım tamamlanır ve 1,25(OH)2D'ye hidroksile edilir [68]. D vitamini oluşumun da böbrekte gerçekleşen tüm süreçlerde; serumdaki düşük kalsiyum, fosfor ve yüksek

PTH seviyeleri “aktive edici”, fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) ve 1,25(OH)2D'nin kendisinde dahil “inhibe edici” etki oluşturabilir [69].

D vitamini kandaki kalsiyum ve fosforun normal sınırlarda kalmasını sağlayarak kemik erimesini önler. Tiroit bezinin fonksiyonları ve normal kan pıhtılaşması için gereklidir [69].

1.1.5.3 Fosfor Metabolizması

Absorbe edilen fosfor hücre membranından fosfat olarak taşınır (31 mg/l elemental fosfor=1 mmol/l fosfat). Plazmaya geçen veya hücre-dışı fosfat 3 yolla yönlendirilebilir: hücre-içine taşınabilir, kemik veya yumuşak dokuda depolanabilir veya böbrekler tarafından elimine edilir [70].

Fosfat genellikle kemiklerde depolanır. Serumdaki fosfat seviyesi, depolanmış miktarın %1'inden azdır. Fosfatın bu şekilde dengelenmesi vücuttaki birçok hücre fonksiyonunun (enerji metabolizması, kemik formasyonu, sinyal iletimleri gibi) çalışması için gereklidir [19, 71]. Fosforun epitel hücrelerinden geri emilimi sodyum gerektiren enerji bağımlı bir taşıma şeklindedir [50]. Fosfat dengesindeki intestinal emilim, tip IIB sodyum-fosfat ko-taşıyıcı (Npt2b) tarafından düzenlenir. Npt2b miktarı, oral yoldan alınan fosfor ve D2 vitamin miktarı ile düzenlenir [70]. Böbrekte 3 tip sodyum-fosfat ko-taşıyıcı bulunur; Npt2a, Npt2c ve Pit-2. PTH salınımına bağlı olarak; fosfat metabolizmasında görevli olan Npt2a dakikalar içerisinde ve Npt2c ve Pit-2 saatler sonrasında aktivasyonları artabilir veya azalabilir [72, 73]. Glomerular filtrasyon düşükçe, serum fosfor miktarı artar ve bu da PTH salınımını indükler [19]. Serumdaki fosfor artışına bağlı olarak osteoblastlarda FGF23 üretimi gerçekleşir. FGF23, böbrekte bulunan Npt2a ve Npt2c taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltır. FGF23'ün üretimine bağlı olarak serumdaki kalsitrol azalır ve PTH sentezini baskılayabilir. FGF23'ün bu özelliğine rağmen böbrek rahatsızlığı çeken kişilerde paratiroid bezlerinin bu büyüme faktörüne karşı direnç geliştirdiği de bildirilmiştir [19, 74].

Fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan başka hormonlar da bulunmaktadır. Örneğin östrojen, FGF23 sentezini artırarak PTH'yı baskılayabilir [75] ve indirekt olarak fosfat emilimini azaltabilir [76]. Bir diğer hormon; tiroit hormonlarıdır. Bu hormonların seviyesindeki artış, böbreklerdeki fosfat emilimini, Npt2a ekspresyonunu ve serumdaki fosfor seviyesini yükseltebilir [77].

İnsanlarda ve sıçanlarda gastrointestinal sistem, fosfat geri emilimini yüksek seviyede duodenum ve jejunumda çok düşük seviyede de ileumda gerçekleştirir [19]. Böbreklerde ise fosfat dengesi glomerulustan filtre edilerek dengelenir. Böbrek yoluyla günlük atılan fosfat miktarı %15 civarındadır. Yaklaşık %85'i geri emilmektedir. Serumdaki fosfor dengesi ise glomerulustan sağlanan, bu geri emilim ile dengelenmektedir.

1.1.5.4 Magnezyum Metabolizması

Magnezyum hücre içerisinde en çok bulunan ikinci divalent katyondur. İnsan vücudunda çok önemli fonksiyonlarda görev alır; hücre sinyal iletimi, proteinler için ko-faktör, DNA sentezi, oksidatif fosforilasyon, kardiovasküler tonüs, kemik formasyonu gibi.

Vucüta toplam 24 gram magnezyum bulunmaktadır %99'u hücre-içi; kemik, kas ve yumuşak dokularda depolanır. Serum magnezyum miktarının; %60'ı iyonize ve fizyolojik olarak aktif formda, %10'u serumdaki anyonlara bağlı, %30'u ise albumine bağlı haldedir [78].

Magnezyumun gastrointestinal sistemdeki geri emilimi, beslenme düzeni ile değişiklik göstermektedir. Magnezyumdan zengin beslenme düzeninde absorpsiyon %25, magnezyum içeriği olarak zayıf beslenme şeklinde ise %75'e kadar emilim değişebilmektedir [19, 79]. Magnezyumun ince barsaktan emilimi hem transsellüler hem de parasellüler yollarla gerçekleşebilmektedir. Transsellüler magnezyum emilimi; katyonik kanal olan, transient reseptör potansiyel kanal-melastatin (TRPM)-6 ve TRPM-7 tarafından gerçekleştirilir [80]. Beslenme ile magnezyum alımı arttıkça, emilim parasellüler yolakla yapılır. Beslenme ile magnezyum alımının azaldığı durumlarda ise TRPM-6 ve TRPM-7 ile transsellüler yolak emilimi sürdürür [19].

Böbrek kanalları boyunca magnezyumun %96'sı geri emilir. Magnezyumun %40-70'inin emilimi; parasellüler yolak ile Henle kulpunun kalın çıkan kol kısmında, transsellüler yolakla ince inen kol kısmında sağlanır [81]. Renal yolla atılım sürecinde, kalsiyum ve magnezyumun absorpsiyonları birbirinden bağımsız olarak gerçekleşir. İleri düzeyde magnezyum eksikliğinde hipoparatiroidi oluşmaktadır. *In vitro* çalışmalar magnezyumun PTH üretiminde kalsiyum iyonu gibi etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [19, 82]. 2015'de Fang ve arkadaşları, paratiroidektomi

yapılan 23 olguda serum magnezyum ve PTH değerlerini takip etmiştir. Bu miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmediğini iletmiştir. Magnezyumun; kalsiyum/fosfor dengesine bağlı olarak, değişiklik gösterebileceğini ifade etmiştir [83].

1.1.6 Paratiroid Hastalıkları

1.1.6.1 Hipoparatiroidi

Paratiroid bezlerinin tiroit cerrahisi sırasında çıkarılması veya kanlanmasıyla bozulması ile hipokalsemi görülür. Aynı zamanda hipokalsemi paratiroid dokusunun embriyonik gelişim bozukluğu veya fonksiyon kaybıyla da oluşabilmektedir. Hipoparatiroidi 2 tiptir; geçici hipoparatiroidi ve kalıcı hipoparatiroidi [84].

Geçici hipoparatiroidi; paratiroidin baskılanması veya yüksek tiroit hormonları sebebiyle kemik rezorpsiyonunun, kemik formasyonundan daha fazla olduğu durumlarda, kalsiyum seviyesinde ki azalma sebebiyle meydana gelebilmektedir [85, 86]. Bu durum, düşen kalsiyum seviyesinin, paratiroid dokusunu PTH salınımı için yeniden uyarmasına kadar devam eder [18].

Kalıcı hipoparatiroidi; paratiroid bezlerinin çıkarılmasıyla veya kanlanmanın kalıcı olarak önlenmesi sonucunda oluşur. Serumdaki kalsiyum seviyesinin takibiyle teşhis konur. Tiroit ameliyatlarından sonra 3-6 ay boyunca devam eden hipoparatiroidi genellikle “kalıcı hipoparatiroidi”dir [84, 86].

1.1.6.2 Hiperparatiroidi

Paratiroid hastalıklarının bir kısmı PTH miktarına bağlı olarak gelişen hiperparatiroididir. Paratiroid bezlerinden biri veya birkaçının herhangi bir neden olmaksızın büyümesi ve PTH salınımını arttırması pHPT olarak adlandırılır. Başka etkenlerle paratiroid bezinin büyümesine sHPT denir. Paratiroid bezleri; D vitamini eksikliği, böbrek yetmezliği gibi durumlarda, kalsiyumu dengelemek için sürekli aktive olur ve bezlerde büyüme görülür [17].

pHPT, CaSR'nin kalsiyum miktarına bağlı oluşturduğu yanıtın bozulmasıyla görülebilen endokrin bir rahatsızlıktır. Sekonder metabolik değişiklikler, kalsiyum dengesindeki bozulma ve PTH'nın düzensizleşmesi ile CaSR'nin fonksiyonunda bozucu etkiler oluşur [87]. pHPT hastalarında; adenomatöz görülme sıklığı, tek bezde %80 veya 4 bezde %10 oranındadır [88].

Kalsiyuma karşı oluşan bu “etkisizleşme” önceki yıllarda CaSR'nin sessizleşmesi olarak düşünülmekteydi. 2009'da Westin [89], 2016'da Koh [90] ve Lee [88]'nin yaptığı çalışmalarla pHPT'nin moleküler mekanizmaları detaylı şekilde tanımlanmıştır. pHPT'de tek etkinin, CaSR'nin kalsiyuma olan etkisizleşmesi olmadığı anlaşılmıştır. Ekspresyon seviyesi olarak dengesiz seyreden moleküler mekanizmalardan; yağ-asitlerinin ligasyon aktivitesi, kalsiyum iyon ligandına alkali iyon bağlanması, ligasyon aktivitesi gerçekleşirken karbon-sülfür bağının ortaya çıkması ve simport aktivitesinin bozulması ile iyon taşınması, hücre adezyonu, katyon ve metal iyonu taşınması gibi moleküler süreçlerin bozulduğu anlaşılmıştır [88-90]. pHPT bazen mitokondriyal DNA'da mutasyon sonucu oluşabilmektedir. 2007'de Costa'nın yaptığı bir çalışmada mitokondriyal DNA mutasyonlarının oksifil temelli adenom dokularında görüldüğü ve hiperplazik dokularda ise bu mutasyonun olmadığını bildirmiştir [91].

Bazı durumlarda böbrek yetmezliği veya D vitamini eksikliği giderilebilir fakat bezlerdeki kontrol dışı PTH salınımı devam ederse bu rahatsızlık ‘tersiyer hiperparatiroidi’ye neden olur [92].

1.2 MAJÖR VE MİNÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE ANTİJENLERİ

1.2.1 Majör Histokompatibilite Antijenleri

Majör histokompatibilite antijenleri, insan lökosit antijenleri (HLA) olarak bilinir. HLA genleri 6. kromozomun kısa kolunda sentromere yakın bir bölgede yerleşmiş olup 4Mbp'lik bir yer kaplar ve 200'den fazla gen bölgesini kodlar [93]. Bu genlerin kodladığı; hücre yüzeyinde veya sitoplazmada bulunan proteinler dokulardaki dağılımına, yapısına ve fonksiyonuna göre 3 grupta incelenir; sınıf I, II ve III molekülleri. Sınıf I; HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H antijenleri, Sınıf II; HLA-DR, -DP, -DQ, -DO, -DM antijenleri kodlar. Sınıf III kompleman sistemde rol alan çeşitli bileşenleri kodlar [94, 95].

1.2.1.1 HLA Sınıf I

HLA sınıf I moleküllerinden -A,-B,-C klasik antijenlerdir, birçok dokuda eksprese olur ve neredeyse tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar. Sınıf I moleküllerinden -E,-F,-G klasik olmayan antijenlerdir. HLA sınıf I antijenleri; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ domainleri ve 15. kromozomda bulunan bir genden kodlanan $\beta 2$ mikroglobulin molekülünden oluşur. Alfa 1, 2 bölgeleri sinyal peptidi ve peptit bağlanma bölgesini içeren bir cep yapısına sahiptir. Polimorfik olmayan $\beta 2$ mikroglobulin ise sınıf I moleküllerinin yapısal olarak bütünlüklerini destekler. Beta-2 mikroglobulin $\alpha 3$ domain ile non-kovalent bağ yapar ve membrana geçiş göstermez [96, 97].

Bu sınıfa ait moleküllerin temel görevi, peptit antijenlerini T hücrelerine sunmaktır [98]. HLA sınıf I molekülleri peptitleri 2 yol ile sunar; taşıyıcı antijen işleme kompleksine (TAP) bağımlı veya TAP-bağımsız olarak. Yabancı peptitler endoplazmik retikulumdan membrana taşınırken TAP-bağımlı veya TAP-bağımsız olsa da ATP gereksinimi her zaman yoktur. Bu taşınma şeklinde ATP'den ayrı bir enerji kaynağının kullanıldığı düşünülmektedir [99].

HLA-A

HLA-A; bir ağır zincir, bir hafif zincir ($\beta 2$ mikroglobulin) içeren heterodimer yapıdadır. Ağır zincir 8 ekzonluk gen bölgesinden kodlanmaktadır. Ekzon 1 sinyal peptidini kodlar. Ekzon-2-3 $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainlerini kodlar ve aynı zamanda peptit bağlanma bölgesi için cep yapısını meydana getirirler. Ekzon-4 $\alpha 3$ domainini, ekzon-5 transmembran bölgeyi ve ekzon-6-7 sitoplazmik kuyruğu kodlar. Polimorfizimden ekzon-2 ve -3 yani peptit bağlanma bölgesini oluşturan domainler sorumludur. 341 a.a. uzunluğundaki bu yapı, 2 disülfid bağı ile 45kDa büyüklüğünde bir moleküldür. 309-332a.a. pozisyonlarından membrana geçiş gösterir. HLA-A ve -B lokuslarının birbirini tekrar eden eş bölgelerden oluştuğu düşünülmekte ve 46 farklı popülasyonda alel frekanslarındaki farklılık ile ayrılmaktadırlar [100].

HLA-B

HLA-B; bir ağır zincir, bir hafif zincir ($\beta 2$ mikroglobulin) içeren heterodimer yapıdadır. Ağır zincir 8 ekzonluk gen bölgesinden kodlanmaktadır. Ekzon 1 sinyal peptidini kodlar, ekzon-2-3 $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainlerini kodlar ve aynı zamanda peptit bağlanma bölgesi için cep yapısını meydana getirirler. Ekzon-4 $\alpha 3$ domainini, ekzon-5 transmembran bölgeyi ve ekzon-6-7 sitoplazmik kuyruğu kodlar. Polimorfizimden ekzon-2 ve -3 yani peptit bağlanma bölgesini oluşturan domainler sorumludur. 362a.a. uzunluğundaki bu yapı, 2 disülfid bağı ile 45kDa büyüklüğünde bir moleküldür. 310-333a.a. pozisyonlarından membrana geçiş gösterir. HLA-A ve -B lokusları birbirini tekrar eden eş bölgelerden oluştuğu düşünülmekte ve 46 farklı popülasyonda alel frekanslarındaki farklılık ile ayrılmaktadırlar [100].

HLA-C

HLA-C; bir ağır zincir, bir hafif zincir ($\beta 2$ mikroglobulin) içeren heterodimer yapıdadır. Ağır zincir 8 ekzonluk gen bölgesinden kodlanmaktadır. Ekzon-1 sinyal peptidini kodlar, ekzon-2, -3 $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ domainlerini kodlar ve aynı zamanda peptit bağlanma bölgesi için cep yapısını meydana getirirler. Ekzon-4 $\alpha 3$ domainini, ekzon-5 transmembran bölgeyi ve ekzon-6-7 sitoplazmik kuyruğu kodlar. Polimorfizimden ekzon-2 ve -3 yani peptit bağlanma bölgesini oluşturan domainler sorumludur. 366a.a. uzunluğundaki bu yapı, 2 disülfid bağı ile 45kDa büyüklüğünde bir moleküldür. 309-333a.a. pozisyonlarından membrana geçiş gösterir [100]. HLA-C

diğer sınıf I moleküllerinden farklı olarak antijen sunumu yerine "doğal öldürücü hücre immunglobulin-benzeri reseptör" (Killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR) için düzenleyici aktivite göstermektedir [101]. KIR domainleri doğal öldürücü hücre (Nk) ve T lenfosit yüzeylerinde bulunur ve immün sistemin "self-hücreleri" tanınması sürecinde etkinlik gösterir. KIR'ler aktive veya inhibe edici etki gösterebilirler. HLA-C, KIR yapısındaki 2 ayrı domainle bağ yapabildiği gösterilmiştir [102].

HLA-E

HLA-E bir ağır zincir, bir hafif zincir ($\beta 2$ mikroglobulin) içeren heterodimer yapıdadır. 358a.a. uzunluğundaki bu yapı, 2 disülfid bağına sahip bir moleküldür. 306-329a.a. pozisyonlarından membrana geçiş gösterir [101]. HLA-E genellikle diğer sınıf I moleküllerinin peptit bağlanma bölgesinden gelen sinyaller ile sınırlı olarak eksprese edilir. Tümör derecelendirilmesinde ve hastalık seyrinde bir marker olarak görülmektedir. Nk hücrelerinin toleransını teşvik eden bu peptit tümör hücre yüzeyinde bulunduğu orana bağlı olarak immün sistemi inhibe edici etkiyi ortaya çıkarttığı düşünülmektedir [103, 104].

HLA-F

HLA-F diğer sınıf I moleküllerinden ayrı olarak endoplazmik retikulumda ve golgi aygıtında lokalizedir. Bazı dokulara ait hücre tiplerinde (dalak ve lenf nodu gibi) hücre membranda bulunabilmektedir. Çok değişken yapıda peptit bağlanma cebi içerir. Antijen sunumunda, spesifik bazı peptitleri sunabilir. Diğer sınıf I moleküllerinin kodlandığı bölgelerden gelen domainler dahil edilerek transkripte edilir. Sitoplazmik kuyruk kısmı, diğer sınıf I moleküllerinden daha kısa bir yapıya sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla HLA-F'in hamilelik, enfeksiyon ve otoimmün rahatsızlıklarda Nk sinyalizasyonunu düzenleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [105, 106].

HLA-G

HLA-G plasental dokuda eksprese edildiği gösterilmiş olup, fetüsün canlılığı ile ilgili fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir [107]. Bu fonksiyonu Nk hücreler, sitotoksik T lenfositleri, makrofajlar üzerinde “tolerans” etkisi sağlayarak gösterdiği bilinmektedir [108]. HLA-A ile protein homodimerizasyonu oluşturduğu ve bazı astım hastalarında HLA-G'ye bağımlı “astım duyarlılığı” oluşturduğu bildirilmiştir [109].

1.2.1.2 HLA Sınıf II

HLA sınıf II molekülleri; -DR,-DP,-DQ klasik ve -DO, -DM gibi klasik olmayan antijenlerdir. Bu eksojen proteinler, B ve T lenfositleri, makrofajlar, dentritik, epitel hücreler ve endotelilyumda eksprese olurlar [93]. Antijen sunumunda bu moleküller fagositoz veya endositoz ile hücre-içine giren yabancı antijenlerin sunumunu sağlarlar [110].

Heterodimer yapıda bulunan sınıf II molekülleri α ve β alt ünitelerinden oluşur. Her iki ünite birbirine kovalent olarak bağlanır. Bu zincirlerin her biri $\alpha 1$, $\beta 1$ ve $\alpha 2$, $\beta 2$ olacak şekilde lokalize olurlar. Peptit bağlanma bölgesi α ve β heterodimerinin tepe noktasına bağlanır. Sınıf II moleküllerine göre peptit bağlanma bölgesi daha esnekler. [98].

Sınıf II klasik antijenleri endoplazmik retikulum içerisinde heteronanomer yapıdadır. Bu moleküller, antijen sunan hücrelerde endozomal peptitleri, hücre membranından T hücrelerine tanıtmakla görevlidir. Eksojen proteinler, antijen sunan hücreler tarafından endositozla içeri alınır. Bu proteinler, lizozomal proteaz/hidrolazlarla parçalanmasıyla sınıf II molekülleri için hazır hale gelirler. Normal hücre döngüsünde üretilen veziküller içerisindeki sınıf II antijenlerinin taşıdığı endojen peptitler, zaman içerisinde degrade olur ve yıkılım sonrası hücre membranından atılır. Eksojen peptit varlığında, sınıf II molekülüne bağlı endojen peptit ile eksojen peptit bu yıkılım öncesinde yarışmalı ve sunumu için bağlanmalıdır. Aynı şekilde; otofaji, endojen peptitler için bir kaynak mekanizmasıdır. Otofagozomlar sıklıkla sınıf II molekülü “bağlanma-kompartmanları” ile birleşir [111, 112].

Antijen sunan hücrelere ek olarak gastrointestinal sistemdeki epitel hücreler sınıf II molekülleri eksprese ederler ve sahip oldukları CD74 molekülü ile antijen sunan hücre gibi davranırlar. Bu mekanizmada, endoplazmik retikulum içerisinde

heterodimer sınıf II yapısına (α ve β) CD74'ün bağlanması ile trimer oluşur (bu yapı aynı zamanda invariant zincir veya sınıf II histokompatibilite antijeni gamma zinciri olarak bilinir). Endozomal/lizozomal sistem içerisinde çeşitli proteazlar sayesinde CD74'ün bir kısmının kırılmasıyla "sınıf II-bağıntılı invariant zincir peptit" (class II-associated invariant chain peptide, CLIP) kısa bir fragmente bağlı halde (CLIP-HLA-sınıf II yapısı) sunuma hazırlanır. Eksojen peptit CLIP'in ayrılmasıyla sınıf II molekülüne bağlanır ve hücre membran yüzeyinden sunumu gerçekleşir. Bu mekanizmada, klasik olmayan sınıf II molekülü HLA-DM, eksojen bir peptit bağlanana kadar sınıf II moleküllerini endozom içerisinde stabil halde tutar. Eksojen bir peptit varlığında (bu peptit yeterli afiniteye sahip ise) CLIP yapısını sınıf II molekülünden ayrılması için teşvik eder. Eksojen molekülün endozomal yapı içerisinde bağlanması sonrasında hızlıca hücre membranından sunumu gerçekleşir. Özellikle B lenfositlerde; HLA-DM'nin sınıf II moleküllerine etkimesi için, HLA-DO (klasik olmayan sınıf II molekülü) ile etkileşime geçmesi gerekmektedir. HLA-DO molekülünü dentritik hücreler de taşımaktadır. Bütün bu sürecin gerçekleştiği lizozomal mikroçevre, bu antijen-bağlanma sisteminde yüksek etkinliğe sahiptir. Yüksek asidite proteolizisi artırır ve etkin peptit yüklemesini teşvik eder [110, 113-118].

HLA-DR

HLA-DR; α ve β zincirinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. Bu zincirlerin her biri 5 ayrı ekzondan kodlanır; ekzon-1 sinyal peptidini, ekzon-2, -3 ekstrasellüler kısmını ve ekzon-4, -5 transmembran domaini ve sitoplazmik kuyruğu kodlar. 254a.a. uzunluğundaki molekülün; α zinciri polimorfizm özelliği taşımaz ve 33-35 kDa büyüklüğündedir. β zinciri ise 26-28 kDa büyüklüğünde olup polimorfik bölgeyi oluşturur. Her bireyde HLA-DRB1 diğer tüm paraloglarından 5 kat daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir [111, 113, 114].

HLA-DP

HLA-DP; α ve β zincirinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. α zinciri 5 ekzondan kodlanır; ekzon-1 sinyal peptidini, ekzon-2, -3 ekstrasellüler kısmını ve ekzon-4, -5 transmembran domaini ve sitoplazmik kuyruğu kodlar. β zinciri ise 6 ekzondan kodlanmaktadır; ekzon-1 sinyal peptidini, ekzon-2, -3 iki ayrı ekstrasellüler kısmı, ekzon-4 transmembran domaini ve ekzon-5 sitoplazmik kuyruğu

kodlar. Bu 260a.a. uzunluğundaki molekülde hem α zinciri hem de β zinciri polimorfik özellik taşımaktadır. α zinciri 33-35 kDa, β zinciri ise 26-28 kDa büyüklüğündedir [111, 113, 114].

HLA-DQ

HLA-DQ; α ve β zincirinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. α zinciri 5 ekzondan kodlanır; ekzon-1 sinyal peptidini, ekzon-2, -3 ekstrasellüler kısmını ve ekzon-4, -5 transmembran domaini ve sitoplazmik kuyruğu kodlar. β zinciri ise 6 ekzondan kodlanmaktadır; ekzon-1 sinyal peptidini, ekzon-2, -3 iki ayrı ekstrasellüler kısmı, ekzon-4 transmembran domaini ve ekzon-5 sitoplazmik kuyruğu kodlar. Heterodimer yapıdaki bu sınıf II molekülü dimer yapısını HLA-DQB2 ile oluşturarak endoplazmik retikulumdan vezikül içerisinde ayrılabilir. Bu 254a.a. uzunluğundaki molekülde hem α zinciri hem de β zinciri polimorfik özellik taşımaktadır. α zinciri 33-35 kDa, β zinciri ise 26-28 kDa [111, 113, 114].

1.2.2 Minör Histokompatibilite Antijenleri

Klasik dogma'da hücre içi proteinler proteozomda parçalanarak HLA-sınıf I antijenleri ile CD8+ T hücrelerine sunulurlar [119, 120]. HLA-sınıf II molekülleri ise hücre-içi veya hücre-dışı peptitleri CD4+ T hücrelerine sunarlar [112, 119, 120]. Normal hücre sel peptitlere, timustaki self-T hücrelerinin negatif seleksiyon ve delesyon özellikleri sayesinde immün sistem tarafından yanıt oluşturulmaz [121]. HLA-eş kemik iliği nakillerinde; alıcının T hücreleri, donörün polimorfik peptitlerini aynı HLA'ları taşıdıkları halde tanıyabilmektedir. Bu polimorfik peptitler minör histokompatibilite antijenleri (MiHa) olarak adlandırılır. Y kromozomundan kodlanan genlerin ürünü "H-Y MiHa" ve diğer kromozomlardan kodlanan genlerin ürünü olan peptitler ise "otozomal MiHa" olarak sınıflandırılır. MiHa'lar alıcı ve donör arasındaki spesifik genetik farklılıkların ürünleridir [119]. MiHa'lar T hücre yanıtı oluşturabilen allo-peptit'ler olarak tanımlanabilir.

Birçok tanımlanmış MiHa'nın immün yanıtındaki rolü bilinmektedir. MiHa'lar ilk olarak; HLA uygunluğu olan nakiller sonrası, greft reddinin oluşmasıyla keşfedilmiştir [122-125]. 1976 yılında Goulmy ve arkadaşları tarafından; HLA uygunluğu olan erkek bir donörden, kadın alıcıya kemik iliği nakli yapıldıktan sonra rejeksiyonun kısa sürede görülmesiyle minör peptit yapıları keşfedilmiştir. Alıcının

kan örneği alınarak sitotoksik T lenfositleri izole edilmiş. Bu hücrelerin donöre ait ve Y kromozomdan gelen bir peptit varlığında, spesifik yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Bu peptidin MiHa sınıflandırmasında cinsiyet spesifik H-Y MiHa ailesinden olduğu bildirilmiştir [125]. Bu keşfin açıklanmasını takiben, rejeksiyon gerçekleşen HLA-eş nakillerin araştırılmasıyla, Y-kromozomunun kodladığı ve cinsiyete spesifik T lenfositleri aktive eden birçok MiHa tanımlanmıştır. Otozomal kromozomlardaki gen bölgelerinden üretilen MiHa peptitleri de dahil olarak 51 genden kodlanan 57 MiHa peptidi detaylı olarak araştırılmıştır. Cinsiyet spesifik ve otozomal eşlikli MiHa peptitleri; delesyon, insersiyon, çerçeve kayması mutasyonları, anlamsız mutasyonlar sonucunda kodlanan kısa protein dizileri olduğu belirlenmiştir [119, 122].

MiHa peptitlerinin belirlenmesi süreci; HLA-tam uygunluğu olan alıcının özelleşmiş T hücre seçimi ile başlar. Klonal çoğalma sonrası aktive olan hücreler, donörden elde edilen (kemik iliği veya kan orijinli) hücrelerle kültüre edilir. Genom boyuntunda tek nükleotit polimorfizm (SNP) bölgeleri ile belirlenir. Bu bölgelerden HLA-sınıflarına ait MiHa bölgeleri seçilir. Bu peptitlerin HLA epitoplarına bağlanma aktiviteleri belirlenir [126]. Burada en önemli aşama; MiHa peptidi ile yeni aktive olan T lenfosit popülasyonunun alıcıdan izole edilmesidir. Yeni aktive T lenfositler HLA-DR+ veya CD137+'tir. Bu saf popülasyonlar elde edilerek ilgili MiHa peptidi bulunabilmektedir [119].

HLA sınıf II bağımlı MiHa antijenleri sayısı 48'dir, bunların 36 tanesi normal okuma çerçevesinde SNP ekzonlardan kodlanır. Gen ürününde yalnızca bir a.a. değişikliği görülür [119]. Alternatif okuma çerçevesinden kodlanan MiHa'lar hücrel fonksiyon göstermeyen proteinleri oluşturur. Bunlar ribozomal protein defektleri (*defective ribosomal products*) olarak bilinir ve translasyon sonrası hızla yıkılırlar [127].

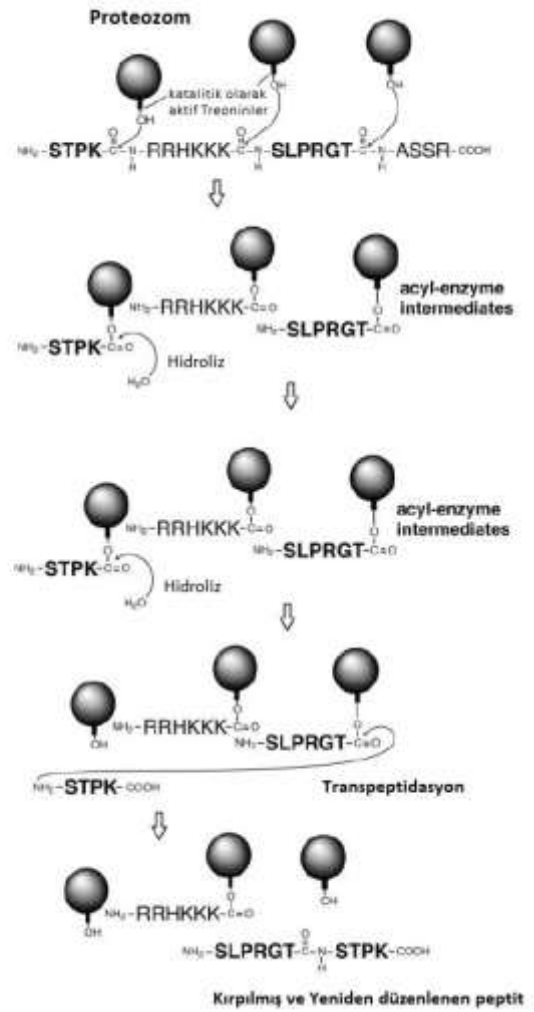
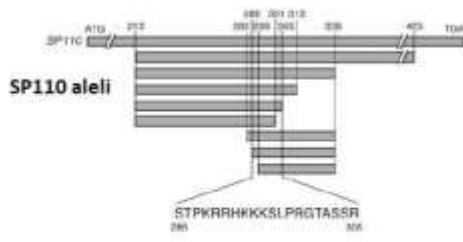
1.2.2.1 SP110

SP110; 2. kromozomun uzun kolundaki 2q37 bölgesinden kodlanan ve otozomal geçiş gösteren bir MiHa peptididir. Bu gen SP100/SP140 ailesi interferon (IFN) ve *all-trans retinoic acid* (ATRA) -indükleyici genlerin aktivasyonunda görev alır. SP100/SP140 nükleoprotein ailesinin bir üyesidir. Nükleoproteinler, multiprotein kompleksleridir. Gen transkripsiyonlarında görev alırlar [128].

2000 yılında Bloch ve arkadaşları, lökosit-spesifik nükleoprotein kodlayan cDNA'yı tanımladılar. Bu cDNA'nın ürünü olan SP110 proteininin, N-terminal ucunun SP100 ve SP140 proteinleri ile homoloji gösterdiği bildirilmiştir. Periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMH) IFN- γ ile muamelesi sonrasında, SP110 ekspresyonunun homoloji gösterdiği proteinlerle birlikte arttığı gösterilmiştir [129].

SP110 peptidini kodlayan cDNA (GenBank numarası: AF280094) 2336bp uzunluğundadır ve normal okuma çerçevesinden 78-2146 nükleotitlik bölge ile 689a.a.'lik bu proteini oluşturur [129, 130]. N-terminal ucu oluşturan 6-159a.a.'lik bölge SP100 ve SP140 proteinleri ile %49 homoloji göstermektedir [129, 131]. Aynı şekilde 452-532a.a.'lik alan SP100 ve SP140 proteinleri ile %53 homoloji gösterir [129, 132]. Bu protein, gen transkripsiyonunda bir aktivatör ve "nükleo-hormon reseptör ko-aktivatör"ü olarak görev alır. Aynı zamanda ribozom biogenezinde rol aldığı düşünülmektedir. Post-transkripsiyonel modifikasyonlarla 7 farklı izoformu oluşmaktadır [128, 129, 133].

2006 yılında Warren ve arkadaşları, SP110 peptidinin HLA-A*0301 alelini taşıyan bireylere spesifik olarak eksprese edildiğini bildirmiştir. Çalışmada SP110 peptidinin *reverse order* kırılma ile sentezini; HLA-A*0301 aleli taşıyan 64 nakil yapılan bireyden aldıkları PKMH'lerinden elde etmişlerdir. SP110 proteinini oluşturan 299.a.a. pozisyonundaki alanin/glisin değişimini göstermişlerdir. Proteozomdaki kırılma sürecinde peptidin hangi sırayla ve hangi katalitik aktiviteye sahip bölgelerden kırıldıklarını detaylı şekilde bildirilmiştir (Şekil 1.1) [134].



Şekil 1.1: SP110 aleli (polimorfizm database erişim kodu:rs1365776) ve *reverse order* ile işlenmesi.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Gereçler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 2.1’de markalarıyla birlikte belirtilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve markaları.

Sarf Malzemeler	Markası
15 ve 50 ml’lik Falcon tüp	Capp
25 ve 75 cm ² ’lik Flask	SantaCruz
2 ml’lik kriyotüpler	Corning
Otomatik mikropipetler	Finnpipette
96’lı mikrolaka	Corning
12’li mikrolaka	Corning
Petri	SantaCruz
1,5 ml’lik ependorf tüpler	Capp
5 ve 10 ml’lik serolojik pipet uçları	Capp
0,2 µm porlu PVDF membran	Biorad
0,45 µm porlu PVDF membran	Thermo Fisher
0,2 ml’lik PZR tüp	İsolab
70 µm <i>strainer</i>	BD Biosciences

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 2.2’de markalarıyla birlikte belirtilmiştir.

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları.

Kimyasal Malzemeler	Markası
McCoy’s 5A Medyum	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Penisilin/ Streptomisin	Gibco
Fötal sığır serumu (FBS)	PanBiotech
PBS	PanBiotech
DMSO	SantaCruz
NEAA	Gibco
HEPES	Gibco
DNase	Applichem
Ham’s F10	Gibco
BSA	Merck
Kollajenaz	Thermo Fisher
HBSS	Gibco
NaCl	Merck

CaCl	Merck
Tris	Sigma
SDS	Merck
APS	Alfa Aesar
TEMED	Alfa Aesar
Bromofenol Blue	Merck
Beta merkaptoetanol	Merck
HCl	Merck
Metanol	Merck
Akrilamid	Affymetrix
Bisakrilamid	Affymetrix
İzopropanol	Merck
Glisin	Affymetrix
ECL	Biorad
Laemmli sample buffer	Biorad
Ficoll	GE Healthcare
Boyalı marker (protein)	Biorad
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Tween 20	Affymetrix
RIPA Lizis Tamponu	SantaCruz
Anti-HLA-A antikor	Abcam
Anti-HLA-B antikor	Thermo Fisher
Anti-HLA-C antikor	Abcam
Anti-HLA-E antikor	Thermo Fisher
Anti-HLA-DR antikor	Thermo Fisher
Anti-HLA-DP antikor	Abcam
Anti-HLA-DQ α 1 antikor	Merck
Anti-HLA-DQ α 2 antikor	Abcam
Anti-SP110 antikor	Abcam
Anti- β actin antikor	Cell Signalling
Anti-mouse IgG antikor	Cell Signalling
Anti-rabbit IgG antikor	Cell Signalling
Süt Tozu	Applichem
Muse Cell Count&Viability Solüsyonu	Milipore
Human Parathyroid Hormone ELISA kit	RayBio Tech
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Applied Science
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems
SensiFAST SYBR Kit	BioLine

2.2 Yöntem

Bezmialem Vakıf Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'ndan onay alınarak (onay tarih ve numarası: 30/11/2016-19446) çalışma gruplarına ait örneklerin toplanmasına başlandı.

Bu çalışma patolojik olarak paratiroid hiperplazi ve adenom tanısı alan, yaşları 25 ile 60 arasında değişen 38 hastada yapıldı. Tüm hastalar endokrinoloji kliniği tarafından değerlendirilerek primer ve sekonder hiperparatiroidi tanısı almış ve tedavi olarak cerrahi müdahale yapılmış hastalardı. Ameliyatta çıkartılan tüm paratiroid lezyonlarının 1/3'ünde ameliyat sırasında frozen kesit tanısı yapıldı. Böylelikle çıkartılan lezyonların paratiroid dokusu olup olmadıkları histopatolojik olarak doğrulandı ve tanı konuldu. Tanı konulduktan sonra dokuların 2/3'ü Bezmialem Paratiroid Taşıma Solüsyonu içerisinde hücre kültür laboratuvarı'na buz içerisinde taşındı. Histopatolojik tanısı doğrulanmış 18 olgunun ameliyat sonrası 10ml'lik heparinli tüp içerisinde kan örnekleri alındı.

Çalışmada, yaşları 18-65 arasında değişen beyin ölümü gerçekleşmiş bireylerden vasinin onam formunu imzalaması ile alınan 6 sağlıklı paratiroid dokusu kullanıldı. Beyin ölümü gerçekleşmiş 2 olgudan periferik kan örneği 10 ml'lik heparinli tüpe alındı.

2.2.1 Paratiroid hücrelerinin izolasyon ve kültürü

Doku örneği laminar kabin içerisine alındı. Buz üzerinde tutulan petri kabında 1X PBS ile yıkandı. Yıkanan doku buz üzerinde, steril petri içerisinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Doku parçaları 12'li mikroparka içerisindeki kuyuya alındı. Doku bırakılan her kuyuya 215U/mL Kollajenaz, 300U/mL Dnase I, 100µg/mL BSA ve %50 Ham's F10 solüsyonu eklendi. 12'li mikroparka 37°C'de ve % 95 nem ile % 5 CO₂'li inkübatörde 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra pastör pipet yardımıyla dokunun dağılması sağlandı ve steril petri içerisindeki 70µm'lik *strainer*'dan geçirildi. Üzerine 10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, %1 eser olmayan amino asit (NEAA), %1 4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic asit (HEPES) ve %10 inaktif fetal sığır serum (FBS) içeren McCoy's 5A hücre kültür medyumuna eklendi. *Strainer*'dan süzülüp petriye geçen hücreler 15ml falkon tüp içerisine konuldu ve 1200 devirde 10dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Hücre pelleti McCoy's 5A kültür

medyumu ile homojen hale getirildi. Canlılık ve sayım için steril ependorf tüpe 20µl hücre süspansiyonu ayrıldı. *Cell Count&Viability* solüsyonuna karıştırılan hücre süspansiyonu Muse Hücre Analiz Cihazında, cihaz protokolüne uygun olarak sayım ve canlılık tayini tamamlandı.

HLA sınıflarının araştırılacağı grup; izolasyon sonrasında kalan hücre süspansiyonları her kriyotüpe 50×10^6 sayıda hücre dondurulacak şekilde hazırlandı ve 1400 devirde oda ısısında (24°C) 10dk santrifüj edilerek, üst faz atıldı. Hücre pelleti üzerine (9:1) oranında hazırlanmış FBS ile DMSO karışımından 1ml eklenerek kriyotüplere alındı. Hücreler sonraki deneyler için, tüm örnekler toplanana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Tüm doku gruplarının toplanarak hücre izolasyonlarının tamamlanması sonrasında, -80°C'de dondurularak muhafaza edilen hücreler 37°C'de önceden ısıtılmış su banyosuna konularak hızla çözünmesi sağlandı. Kriyotüpler laminar kabin içerisine alkol ile dışı silindikten sonra aktarılarak önceden hazırlanan McCoy's 5A hücre kültür medyumu ile birlikte süspanse hale getirildi. Her doku grubu için hücreler 3 ayrı 25cm²' lik flask içerisinde 3., 6. ve 9. günde protein ekstraksiyonu yapılana kadar kültüre edildiler. Kültür süresince her 3 günde bir medyum değiştirildi. Her medyum değiştirilen gruptan parathormon ölçümü için kültür medyumu alınarak ELISA deneyi yapılana kadar -80°C'de saklandı. Hücrelerin proliferasyonları, pasajları ve takip işlemleri ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Dondurulan kriyotüplerden her örnek doku için 1 kriyotüp açıldıktan hemen sonra, protein ekstraksiyonu için hazırlandı. Bu gruplar 0. gün örnekleri olarak kabul edildi.

MiHa SP110 peptidinin araştırılacağı grup; hücre izolasyonları tamamlandıktan ve hücre canlılık-sayım sonrasında adenomatöz ve hiperplazi örneklerinden 50×10^6 sayıda hücre protein ekstraksiyonu için hazırlandı. Kalan hücreler, 1400 devirde 24°C 10 dakika santrifüj edilerek, üst fazları atıldı. Hücre pelleti üzerine (9:1) oranında hazırlanmış FBS ile DMSO karışımından 1 ml eklenerek kriyotüplere alındı. Sağlıklı paratiroid dokusu örnekleri hücre izolasyonlarını takiben hücre canlılık-sayım sonrasında protein ekstraksiyonu için hazırlandı.

2.2.2 Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu

Kan örnekleri 10ml'lik heparinli tüp içerisine alındıktan sonra steril şartlarda PKMH'ler izole edildi. Alınan 10ml kan örneği 50ml'lik falkon tüp içerisinde aynı

miktarda 1X PBS tamponu ile karıştırıldı. 15ml'lik falkon tüpe 1/3 *Ficoll* ve 2/3 sulandırılmış kan eklendi. Tüpe ilk olarak *Ficoll* konuldu. Daha sonra *Ficoll*'un üzerinde tabaka oluşturacak şekilde tüpün kenarından sızdırarak sulandırılan kan eklendi. Tüp içeriği, iki tabakanın karışmamasına dikkat edilerek 2500 devirde oda ısısında (24°C) 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, tüplerde en dipten sırasıyla, kırmızı hücre (eritrosit-trombosit) çökeltisi, *Ficoll*, beyaz bulutumsu kısım (*buffy coat*) ve plazma tabakasının olduğu gözlemlendikten sonra, PKMH'lerinin bulunduğu *buffy coat* kısım dikkatli bir şekilde steril pastör pipet ile alındı. PKMH'ler, 1 defa 10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin ve %10 FBS içeren RPMI-1640 medyumunu ile 1500 devirde oda ısısında (24°C) 10dk yıkandı. Yıkama sonrasında üst faz atıldı ve hücre pelleti üzerine (9:1) oranında hazırlanmış FBS ile DMSO karışımından 1ml eklendi. Resüspanse edildikten sonra kriyotüplere alınan hücreler -80°C'de tüm muhafaza edildi. Tüm grupların kan örnekleri tamamlandıktan sonra PKMH örneklerinin 37°C'de önceden ısıtılmış su banyosuna konularak hızla çözünmesi sağlandı. Hücreler RPMI 1640 hücre kültür medyumunu ile birlikte süspanse hale getirildi ve 1400 devirde 10dk santrifüj edilerek yıkandı. Üst faz atılarak, hücre pelletleri protein ekstraksiyonu için hazırlandı.

2.2.3 Parathormon ELISA Deneyi

Mikroplaka'nın hazırlanması; kit içerisindeki 96'lı mikroplaka oda sıcaklığına gelmesi için -20°C'den çıkartıldı. 5X *Assay Diluent* tozu distile su ile çözdürüldü ve anti-PTH antikoru ile karıştırıldı. Kaplanacak antikor karışımı, 1X *Assay Diluent* solüsyonu hazırlanarak 100 kat dilüsyon yapıldı ve 100µl olarak 96'lı mikroplakalara dağıtıldı. Plaka +4°C'de bir gece 60 devirde çalkalayıcı üzerinde bağlanmaya bırakıldı.

Biyotinlenmiş PTH ve standartların hazırlanması; biyotinlenmiş PTH 1X *Assay Diluent* solüsyonu ile son konsantrasyonu 40pg/ml olacak şekilde çözdürüldü. Bu örnekten 100µl pozitif kontrol tüpüne alınarak karıştırıldı. Aynı örnekten 450µl standartların dilüsyonu için ayrıldı. 15ml'lik 6 ayrı falkon tüpü 1,000pg/ml, 100pg/ml, 10pg/ml, 1pg/ml, 0.1pg/ml ve 0pg/ml konsantrasyonlarında etiketlendi. Biyotinlenmiş PTH örneğinden 450µl PTH standart tozu üzerine eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım 1000pg/ml stok olarak kodlandı. Daha sonrasında 10:1

şeklinde kademeli olarak *IX Assay Diluent* solüsyonu ile tüm standartların konsantrasyonları hazırlandı.

Örneklerin ve standartların eklenmesi; kültüre edilerek üst fazı -80°C 'de saklanan süpernatant örnekleri buz üzerine alınarak ELISA deneyi için çözündürüldü. Bağlanma aşaması tamamlanan 96'lı mikropılaka içerisindeki antikor solüsyonu ELISA yıkayıcı ile aspire edildi. Her örnek, standartlar ve pozitif kontrol ikili olarak 96'lı mikropılaka içerisine $100\mu\text{l}$ olarak eklendi, oda sıcaklığında 2,5 saat 60 devirde çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

ELISA test uygulaması; inkübasyon sonrası 96'lı mikropılaka, ELISA yıkayıcı ile aspire edildi ve *IX Wash Solution Buffer* ile $300\mu\text{l}$ hacimde eklenerek 4 defa yıkandı. Her kuyuya $100\mu\text{l}$ *HRP-streptavidin* solüsyonu eklendi ve 45dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular aspire edilerek 4 defa tekrar yıkandı. Sonrasında her kuyuya $100\mu\text{l}$ *TMB One-Step Substrate* solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında $50\mu\text{l}$ *Stop* solüsyonu eklenerek 96'lı mikropılaka 450nm 'de ELISA okuyucuda ölçümü tamamlandı. Microsoft Excel programı kullanılarak standartların optik dansite değerlerinden standart eğrisi oluşturuldu ve örneklerdeki parathormon değerleri buna göre hesaplandı.

2.2.4 Protein Düzeyinde Ekspresyon Belirleme Deneyleri

HLA sınıflarının araştırılacağı örneklem gruplarında her örnek 9 güne kadar kültüre edildi ve kültüre edilen grupların 0., 3., 6. ve 9. günlerinde hücreler 15ml 'lik falkonlara toplanarak 1400 devirde 10dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ELISA deneyi için ayrılan serum örneğinden sonra fazla kalan süpernatant kısmı atıldı. Hücre pelleti protein ekstraksiyonu için kullanıldı. Protein ekstraksiyonu için oluşturulan örneklem grupları ve içerikleri aşağıdaki Tablo 2.3'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3: HLA Sınıf I ve II'nin araştırılacağı hücre örnek grupları (+: protein örneği mevcut, -: protein örneği olmayan)

	Adenomatöz Paratiroid Dokusu (n=10)	Hiperplazik Paratiroid Dokusu (n=10)
0. gün	+	+
3. gün	+	+
6. gün	+	+
9. gün	+	+

MiHa SP110 peptidinin araştırılacağı hücre örnek grupları ve her dokusu kullanılan bireyin PKMH örneğini de içerecek şekilde -80°C 'de dondurularak saklanan hücreler

çözdürülerek protein ekstraksiyonu için kullanıldı. Protein ekstraksiyonu için oluşturulan örneklem grupları ve içerikleri aşağıdaki Tablo 2.4’de özetlenmiştir.

Tablo 2.4: MiHa SP110 peptidinin araştırılacağı hücre örnek grupları (+: protein örneği mevcut, -:protein örneği olmayan)

	Adenomatöz Paratiroid Dokusu (n=10)	Hiperplazik Paratiroid Dokusu (n=10)	Sağlıklı Paratiroid Dokusu (n=2)
PKMH (n=22)	+	+	+

2.2.5 Total Protein İzolasyonu

Protein izole etmek için RIPA Lizis solüsyonu kullanıldı. Bu lizis solüsyonu içerisine 200mM proteaz inhibitörü kokteyli ve 100mM sodyum ortovanadat eklendi. Protein ekstraksiyonu için hazırlanan her 50×10^6 hücreye 300µl lizis solüsyonu kullanılarak buz üzerinde 4x15 saniyelik vorteks ile lizis işlemi yapıp -80°C ’de bir gece bekletildikten sonra 14000 devirde $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 20dk santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz PCR tüplerine toplandı. Bu aşamadan sonra örnekler protein miktar tayini için hazır duruma getirildi.

2.2.5.1 Bradford metoduna göre protein miktar tayini

Protein miktar tayini için Bradford metodu kullanıldı. Bu metod için kullanılacak solüsyonlar; 100mg *coomassie brilliant blue G-250*, 50ml %95 ethanol içerisinde çözdürüldü. Çözündükten sonra üzerine 100ml fosforik asit eklendi ve solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlandı. Bir gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda çözünmeye bırakıldı. *Whatman* filtre kağıdından geçirilip, ışık almayacak şekilde saklandı. Standart eğri oluşturmak için 1mg/ml bovine serum albumin (BSA) stok solüsyonu hazırlandı. Yedi kademeli dilüsyon yapılarak standartlara ait konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan BSA standartları ve örnekler (1:100 dilüsyonla, 3’lü tekrarlarla çalışıldı) 96’lı mikrolaka içerisine konularak 595nm’de absorbansları ELISA okuyucuda ölçüldü. Standartların absorbans ve konsantrasyon değişim değerlerine göre standart eğri oluşturuldu ve oluşturulan eğriye ait 3.derece denklem kullanılarak örneklerin protein miktarları hesaplandı.

2.2.6 Protein Jel Elektroforezi

2.2.6.1 Kullanılan tamponlar

Kullanılan tamponların hazırlanışları aşağıdaki Tablo 2.5’de verilmektedir.

Tablo 2.5: Jel elektroforezi için kullanılan tamponların içerik ve miktarları

Tampon	Hazırlanışı
4X Ayırıştırıcı Tampon	(1.5 M Tris/HCL pH: 8.8; % 0.4 SDS) 18.2 g Tris/HCL + 0.4 g SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml’ ye tamamlanır.
4X Yığıcı Tampon	(0.5 M Tris/HCL pH: 6.8; % 0.4 SDS) 6.1 g Tris/HCL + 0.4 g SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml’ ye tamamlanır.
% 12 Ayırıştırıcı Jel	Distile su 3.2 ml + % 30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (29:1) 2.7 ml + 4x Ayırıştırıcı Tampondan 2.5 ml + % 10 APS 0.1 ml + TEMED 0.01 ml
% 4 Yığıcı Jel	Distile su 6.1 ml + % 30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (29:1) 1.3 ml + 4x Yığıcı Tampondan 2.5 ml + % 10 APS 0.1 ml + TEMED: 0.01 ml
%17 Ayırıştırıcı Jel	Distile su 1.7 ml + % 30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (29:1) 5.7 ml + 4x Ayırıştırıcı Tampondan 2.5 ml + % 10 APS 0.1 ml + TEMED 0.01 ml
10X Yürütme Tamponu	30 g Tris baz + 144 g Glisin + 10 g SDS + 4.5 ml konsantre HCl toplam hacim 1L olacak şekilde çözülür. Tampon çalışma esnasında distile suyla 1x konsantrasyonuna getirildi.

% 4-12’lik SDS-PAGE jel ve protein örneklerinin hazırlanması

SDS-PAGE jeli için 4x konsantrasyondaki ayırıştırıcı (*seperating*) ve yığıcı (*stacking*) tamponlar hazırlandı. %12’lik ayırıştırıcı jel hazırlanarak 1mm kalınlıkta jel ünitesine döküldü. Ayırıştırıcı jel yüzeyinin düz olması için izopropanol eklendi ve donması beklendi. Ayırıştırıcı jelin donmasını takiben, izopropanol dikkatlice filtre kâğıdı ile emdirilerek sistemden uzaklaştırıldı. Hazırlanan %4’lük yığıcı jel eklenerek 10 kuyulu jel tarakları sisteme yerleştirildi. %4-12’lik SDS-PAGE jeli donduktan sonra 1X yürütme tamponu hazırlanarak, dikey elektroferez sistemine eklendi.

Çalışmada Bradford yöntemi ile konsantrasyonları tayin edilen protein örnekleri 30µg/ml olacak şekilde 4X *Laemmli* Örnek tamponu ile hazırlandı. Örnekler tamponla karıştırıldıktan sonra 95°C’de 5dk ısıtıcı blok içerisinde inkübe edildi ve sonrasında buza alındı.

Proteinlerin ayrıştırılması için hazırlanan %4-12'lik SDS-PAGE jelin ilk kuyusuna boyalı marker devamında protein örnekleri yüklenerek 120V'ta 1 saat süreyle yürütüldü. Proteinlerin iyi ayrıştığı belirlenmesinin ardından *Western Blot* çalışmalarındaki ikinci basamak olan transfer aşamasına geçildi.

% 4-17'lik SDS-PAGE jel ve protein örneklerinin hazırlanması

SDS-PAGE jeli için 4x konsantrasyondaki ayrıştırıcı (*seperating*) ve yığıcı (*stacking*) tamponlar hazırlandı. % 17'lik ayrıştırıcı jel hazırlanarak 1mm kalınlıkta jel ünitesine döküldü. Ayrıştırıcı jel yüzeyinin düz olması için izopropanol eklendi ve donması beklendi. Ayrıştırıcı jelin donmasını takiben, izopropanol dikkatlice filtre kağıdı ile emdirilerek sistemden uzaklaştırıldı. Hazırlanan %4'lük yığıcı jel eklenerek 10 kuyulu jel tarakları sisteme yerleştirildi. %4-17'lik SDS-PAGE jeli donduktan sonra 1X yürütme tamponu hazırlanarak, dikey elektroforez sistemine eklendi.

Çalışmada Bradford yöntemi ile konsantrasyonları tayin edilen protein örnekleri 30µg/ml olacak şekilde 2X Laemmler Örnek tamponu ile hazırlandı. Örnekler tamponla karıştırıldıktan sonra 95°C'de 7dk ısıtıcı blok içerisinde inkübe edildi ve sonrasında buza alındı.

Proteinlerin ayrıştırılması için hazırlanan %4-17'lik SDS-PAGE jelin ilk kuyusuna boyalı marker devamında protein örnekleri yüklenerek 50V'da 15dk, 80V'da 3 saat süreyle yürütüldü. Proteinlerin iyi ayrıştığı belirlenmesinin ardından *Western Blot* çalışmalarındaki ikinci basamak olan transfer aşamasına geçildi.

Transfer

Transfer basamağı için gerekli tamponların hazırlanışları Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2.6: Transfer aşaması için kullanılan tamponların içerik ve miktarları

Tampon	Hazırlanışı
Transfer Tamponu	40ml 5X Trans Blot Turbo Transfer tamponu + 40ml Metanol + 80ml distile su
20X TBS	48.8gr Tris Baz + 160gr NaCl + 800ml Distile su, pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra tampon 1L'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
1X TBST	50ml 20X TBS + 950ml distile su + %0,2 Tween-20

Jel elektroforez işlemi tamamlanmadan 15dk kadar önce 3 ayrı küvete sırasıyla metanol, distile su ve 1X transfer tamponu eklendi. Jelin büyüklüğüne göre kesilmiş 0.2µm veya 0.45µm gözenek büyüklüğü olan PVDF membran 2dk arayla tamponlarda bekletilerek aktive edildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel

filtre kurutma kağıtları ve membran arasına yerleştirilerek transfer için sandviç modeli oluşturuldu.

%4-12'lik SDS-PAGE ile ayrılan proteinlerin, 0,2µm gözenek büyüklüğü olan PVDF membrana transferi, 25V ve 1.3mA'de 25dk süreyle yarı-kuru sistemle gerçekleştirildi.

%4-17'lik SDS-PAGE ile ayrılan proteinlerin 0,2µm ve/veya 0,45µm gözenek büyüklüğü olan PVDF membrana transferi, 20V ve 1mA'de 35dk süreyle yarı-kuru sistemle gerçekleştirildi.

Transfer tamamlandıktan sonra membran spesifik olmayan reaksiyon odaklarının bloke edilmesi amacıyla 1X TBST ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde 4°C'de bir gece bekletildi.

Primer/sekonder antikor ile muamele ve kemilüminesan reaksiyonu

Primer ve sekonder antikorlar 1X TBST ile %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde aşağıdaki Tablo 2.7'de gösterilen oranlarda hazırlandı. Kullanılan antikorlar seçilirken uygunlukları blast analizi ile kontrol edildi.

HLA-A antikorü; 341a.a.'lik ürünün 50-150 a.a.lik ara dizisine bağlanmaktadır (Uniprot ID:P01891). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-A protein sekanslarına uygunluk oranı %98,5'dir.

HLA-B antikorü; 362a.a.'lik ürünün 1-292 a.a.lik ara dizisine bağlanmaktadır (Uniprot ID:P01889). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-B protein sekanslarına uygunluk oranı %93,4'dür.

HLA-C antikorü; 366 a.a.'lik ürünün ekzon 4 ve 5'ten kodlanan ve transmembran bölgesinde içeren, C-terminal bölgesine bağlanmaktadır (Uniprot ID:P04222). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-C protein sekanslarına uygunluk oranı %84'dür.

HLA-DR antikorü; 254a.a.'lik ürünün 150-250 a.a.lik ara dizisine bağlanmaktadır (Uniprot ID:P01903). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-R protein sekanslarına uygunluk oranı %95,5'dir.

HLA-DP antikorü; 260a.a.'lik ürünün 11-260 a.a.lik ara dizisine bağlanmaktadır (Uniprot ID:P20036). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-DP protein sekanslarına uygunluk oranı %98'dir.

HLA-DQ α 1 antikoru; 254a.a.'lik ürünün ekzon 4'ten kodlanan ve transmembran bölgesini de içeren C-terminal bölgeye bağlanmaktadır (Uniprot ID:01909). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-DQ α 1 protein sekanslarına uygunluk oranı %98,7'dir.

HLA-DQ α 2 antikoru; 35-84.a.a.'lik kısım ve N-terminal bölgeye bağlanmaktadır (Uniprot ID:01906). Bu bağlanma bölgesi için yapılan blast analizinde insan HLA-DQ α 2 protein sekanslarına uygunluk oranı %97,4'dir.

Tablo 2.7: Kullanılan primer ve sekonder antikorların final konsantrasyonları

Antikor	Konsantrasyon
B-aktin	1:3000
HLA-A	1:2000
HLA-B	1:500
HLA-C	1:1000
HLA-DR	1:200
HLA-DP	1:1000
HLA-DQ α 1	1:5000
HLA-DQ α 2	1:3000
SP110	2 μ g/ml
Anti-mouse IgG	1:3000
Anti-rabbit IgG	1:3000

Primer antikor inkübasyon +4°C'de bir gece uygulandı ve sonrasında membran 1X TBST ile 5 defa 5dk 80 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Ardından sekonder antikor inkübasyonu oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı ve membran 1X TBST ile 5 defa 5dk 80 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Görüntüleme işlemine geçildi. Kemilüminesan görüntüleme için *ECL* kiti içerisindeki substratlar 1:1 oranında karıştırılarak, asetat kağıdı üzerine alınan membrana eklendi. 1 dakika inkübe edildikten sonra membran büyüklüğünde kesilmiş asetat kağıdı ile membran hava kalmayacak şekilde kapatılarak görüntüleme ve analizi dökümantasyon sistemiyle sağlandı. Western blotlama sonucunda elde edilen bantların derecelendirilmesi ImageJ programı ile belirlendi.

2.2.7 mRNA Düzeyinde Ekspresyon Belirleme Çalışmaları

Hedef MHC genlerimiz olan HLA-A, -B, -DR, -DQ antijenlerinin ekspresyon miktarlarının mRNA düzeyinde rölatif olarak belirlenmesi amacıyla; kültüre edilen paratiroid hücrelerinden sağlıklı paratiroid örnekleri (n=5), adenomatöz paratiroid

örnekleri (n=11) ve hiperplazik paratiroid örnekleri (n=33) kültürün 0,3,6.günlerine ait total RNA izolasyonları yapıldı. Sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi ve belirlenen qRT-PCR protokolleri ile mRNA seviyesindeki gen ekspresyonları belirlendi.

2.2.7.1 Total RNA izolasyonu

Paratiroid hücrelerinin mRNA ekspresyon analizleri için *High Pure RNA Isolation Kit* ile her gruptan 20×10^6 hücre kullanılarak total RNA izolasyonları yapıldı.

Deney düzeneğindeki kültüre edilen her hücre grubu ependorf tüplere aktararak 2500 devirde 5dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 200µl 1X PBS içerisinde resüspanse edildi. Hücrelerin üzerlerine 400µl lizis tamponu eklendi. Karışım 15sn vorteks yardımıyla resüspanse edildikten sonra cam lifli filtrelili tüplere aktarıldı. 10000 devirde 15sn santrifüj edildikten sonra filtrenin altına geçen süpernatant atıldı. 90µl DNase I inkübasyon tamponu ve 10µl DNase I' den oluşan karışım hazırlandı ve tamamı filtrelili tüpe aktararak 15dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu tamamlanmış hücrelerin üzerine 500µl yıkama tamponu I eklenip, 10000 devirde 15sn santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Sonra 500µl yıkama tamponu II eklenip, 10000 devirde 15sn santrifüj ve yeniden 200µl yıkama tamponu II eklenip, 13000 devirde 2dk santrifüj sonrası filtre yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı. Son olarak 30-50µl *Elution Buffer* eklenip, 10000 devirde 1dk santrifüj edildikten sonra tüpte toplanan çözelti total RNA'mızı oluşturdu. Elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı NanoDrop cihazıyla ölçüm yapılarak ng/ml olarak belirlendi.

2.2.7.2 cDNA sentezi

İzole edilen total RNA'lardan komplementer DNA'larının (cDNA) sentezi için *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* kullanıldı. cDNA sentezi için 10µl total RNA kullanılarak cDNA reaksiyonu için aşağıdaki karışım hazırlandı (Tablo 2.8). Total RNA'ların üzerine hazırlanmış olan reaksiyon karışımı eklendikten sonra örnekler 25°C'de 10dk, 37°C'de 120dk, 85°C'de 5dk ve 4°C'de 5dk olacak şekilde programlanan *thermal cycler* PZR cihazına yerleştirildi. Reaksiyon süresinin sonunda elde edilen cDNA örnekleri gen ekspresyonlarını belirleme aşaması için yapılacak qRT-PZR işlemine geçilene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 2.8: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı (n=1 için gösterilmiştir).

İçerik	Miktar
10X RT Buffer	2µl
25X dNTP Karışımı	0.8µl
10X RT Random Primer	2µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1µl
ddH ₂ O	4.2µl
cDNA	10µl
Toplam Hacim	20µl

2.2.7.3 HLA sınıf I ve II'nin mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen cDNA' lardan hedef genlerimiz olan HLA-A, -B, -DR, -DQ antijenlerinin mRNA seviyesindeki azalış veya artış oranları referans gen (β -aktin) ekspresyonu ile kıyaslanması sonrasında saptandı. Bunun için, tablo 2.9'da gösterilen primerler HLA-A, -B, -DR, -DQ genlerine özgül olarak tasarlanıp sentezletirildi. Bu genlere özgül liyofilize halde gelen primerler son konsantrasyonları 100µM olacak şekilde PZR saflığındaki su ile çözülerek ana stokları hazırlandı. Hazırlanan stoktan 1/10 dilüsyon yapılarak 10µM final konsantrasyonlardaki ara stoklar oluşturuldu. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları (T_m) gradient PZR yapılarak belirlendi. Her primer dizisi ve özgül T_m değerleri Tablo 2.9'da gösterilmiştir.

Tablo 2.9: HLA genlerine özgül primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.

Grup	Primer Dizisi	T _m
HLA-A	İleri: TTGAGAGCCTACCTGGATGG	61°C
	Geri: TGGTGGGTCATATGTGTCTTG	
HLA-B	İleri: CTTCAAGAGCCTCTGGCATC	60°C
	Geri: AGGGGTCACAGTGGACACA	
HLA-DR	İleri: ACCTGGTTGCTACTGGTTCG	63°C
	Geri: ATCAATGCTGGGACTTCAGG	
HLA-DQ	İleri: TTGTGTTCCACCCTTGG	59,4°C
	Geri: AAGGGCAGAGCGTATCCAT	

Her bir örnek için 6µl distile su, 1µl reverse primer, 1µl forward primer, 10µl *SensiFAST SYBR Mix* (2X konsatire) eklenerek mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Hazırlanan PCR karışımı homojen hale getirilmesi için vortekslenerek kısa süreli santrifüj edildi. PCR karışımı, her bir örnek için lightcycler kapiller tüplere 18µl olacak şekilde aktarıldı ve 2µl cDNA örnekleri eklendi. Termal döngü, 95°C'de 2dk

1 siklus ön denatürasyonun ardından toplam 40 siklusk 95°C 5sn denatürasyon, her primere özgü T_m'ye göre 10sn bağlanma ve 72°C'de 20sn sentez ile tamamlandı.

SYBR Green hidrolizine bağlı floresan artışı görülen inceleme örneklerinden elde edilen grafiklerdeki *cycle of threshold* (CT) verileri değerlendirildi.

mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için yapılan gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) deneylerinde kullanılan 49 örneğin her biri ikili olarak çalışıldı ve elde edilen CT değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin artış, azalış oranları 2-ΔΔCt (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Yöntem formülü;

$$\Delta CT = CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})$$

$$\Delta\Delta CT = [CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})]_{\text{hasta}} - [CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})]_{\text{kontrol}}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Ürün miktarı oranı}$$

2.2.8 İstatistiksel analiz

Grup ortalamaları arası farklılıklar *student-t* testi, diğer analizler one way ANOVA ile GraphPad programında yapıldı. P≤0.05 olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Bulgular

3.1.1 Çalışma grupları

Çalışmada paratiroid dokusunun immünojenik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; hiperplazik, adenomatöz ve sağlıklı paratiroid dokularında HLA moleküllerinin ekspresyonlarının araştırılması ve MiHa SP110 peptit varlığı açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

HLA moleküllerinin değişiminin araştırılacağı grupta; sHPT tanısı almış yaşları 37-55 arasında değişen 11 hastanın paratiroid hiperplazi dokusu, pHPT tanısı almış yaşları 25-62 arasında değişen 10 hastanın paratiroid adenom dokusu ve beyin ölümü gerçekleşmiş bireylerden yaşları 47-61 arasında olan 4 bireyin sağlıklı paratiroid dokuları kullanıldı.

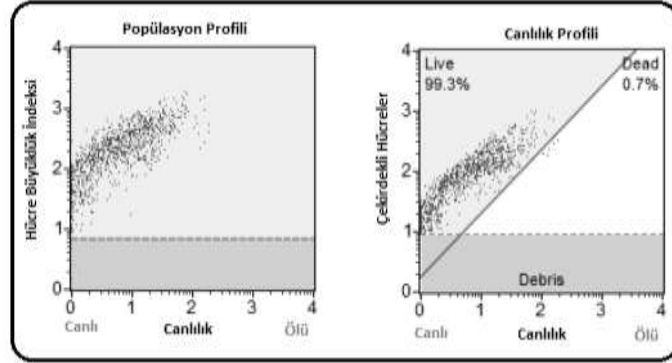
MiHa SP110 peptidinin varlığının araştırılacağı grupta; sHPT tanısı almış yaşları 32-54 arasında değişen 9 hastanın paratiroid hiperplazi dokusu ve aynı bireylerin PKMH örnekleri, pHPT tanısı almış yaşları 25-43 arasında değişen 10 hastanın paratiroid adenom dokusu ve beyin ölümü gerçekleşmiş bireylerden yaşları 53-59 arasında olan 2 sağlıklı bireyin paratiroid dokuları ve aynı bireylerin PKMH örnekleri kullanıldı.

3.1.2 Hücre İzolasyonları

HLA antijenlerinin araştırılacağı gruba ait 25 dokunun enzimatik izolasyonları sonrasında Muse hücre analiz cihazı ile canlılık ve sayım tayini yapıldı. Bu verilere göre paratiroid hiperplazi dokularının ortalama canlılık oranı %98,3 (Şekil 3.1), paratiroid adenom dokularının ortalama canlılık oranı %91,5 ve sağlıklı paratiroid dokularının ortalama canlılık oranı %83,7'dir. Bütün sayım verileri Şekil 3.1'de gösterilen kapılama ayarları ile yapıldı. Dokuların büyüklüklerine göre izolasyon sonrası elde edilen hücre miktarları farklıdır.

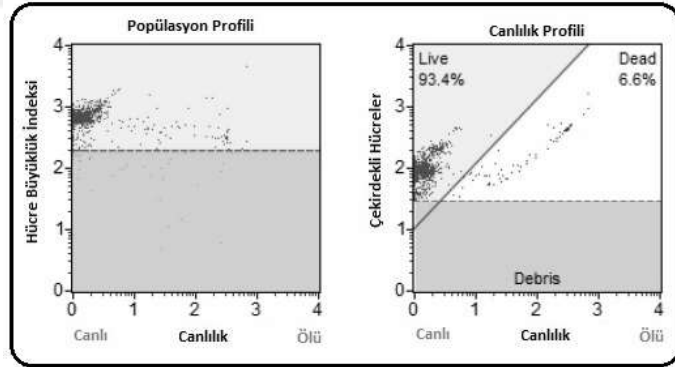
Paratiroid hiperplazi ve adenom dokularının izolasyonları tamamlanarak 25cm²'lik hücre kültür flasklarında kültüre edildi. İzolasyonun tamamlandığı gün kültürün

sıfıncı günü kabul edilerek ve yaklaşık $30-50 \times 10^6$ hücre; her gruptan ayrılarak yarısı total protein izolasyonuna, kalan yarısı ise RNA izolasyonuna tabii tutuldu.



Şekil 3.1: Dört numaralı paratiroid hiperplazi dokusunun Muse hücre analiz cihazındaki canlılık profili.

MiHa Sp110 peptit varlığının araştırılacağı gruba ait 21 dokunun hücre izolasyonları yapıp canlılık profilleri tanımlandı. Şekil 3.1'deki kapılama ayarları kullanılarak Muse hücre analiz cihazında sayım tamamlandı. Aynı şekilde her bireyin PKMH izolasyonları tamamlanarak, canlılık ve sayım profilleri belirlendi (Şekil 3.2). Bütün PKMH örnekleri Şekil 3.2'de gösterilen kapılama ayarları kullanılarak sayıldı.



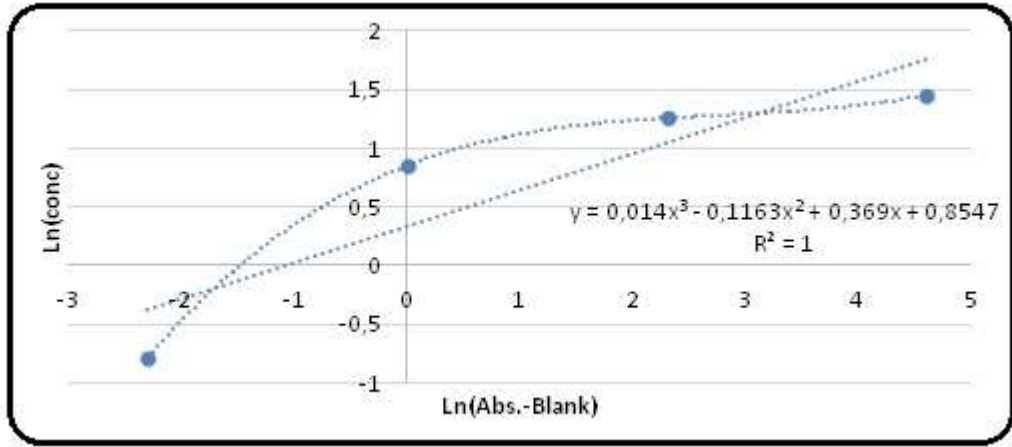
Şekil 3.2: İki numaralı paratiroid adenom doku vericisine ait PKMH'lerin Muse hücre analiz cihazındaki canlılık profili.

Hücre izolasyonları yapılan ve canlılık profilleri tanımlanan, MiHa Sp110 peptidinin araştırılacağı gruba ait 21 doku ve 21 PKMH örnekleri total protein izolasyonuna tabii tutuldu.

3.1.3 Parathormon ELISA

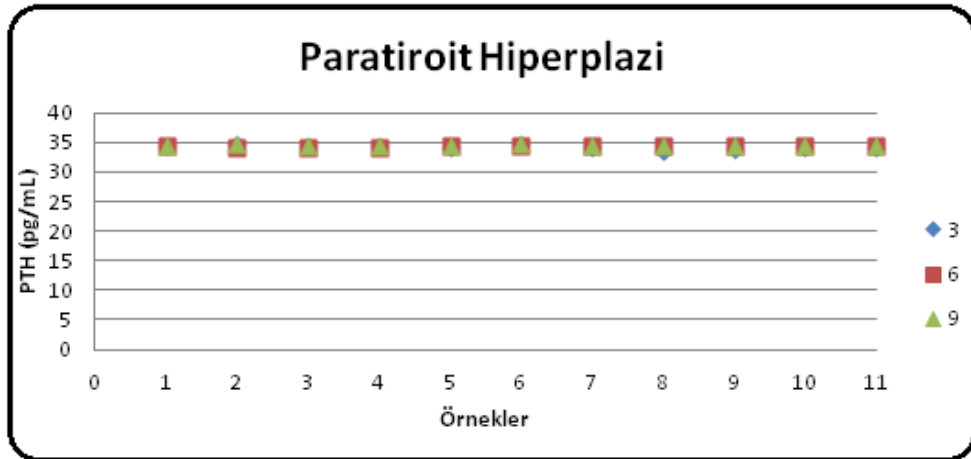
HLA antijenlerinin araştırıldığı ve 9 güne kadar kültüre edilen ve -80°C 'de saklanan supernatant örneklerine ait PTH değerleri, ELISA yöntemiyle belirlendi. PTH ELISA

kitine ait standartların optik dansite değerlerine göre oluşturulan standart eğri ve bu eğriye ait üçüncü derece denklem Şekil 3.3’de verilmektedir.



Şekil 3.3: PTH ELISA standartlarına ait optik dansite değerlerinden oluşturulan standart eğri ve bu standart eğriye ait 3. derece denklem.

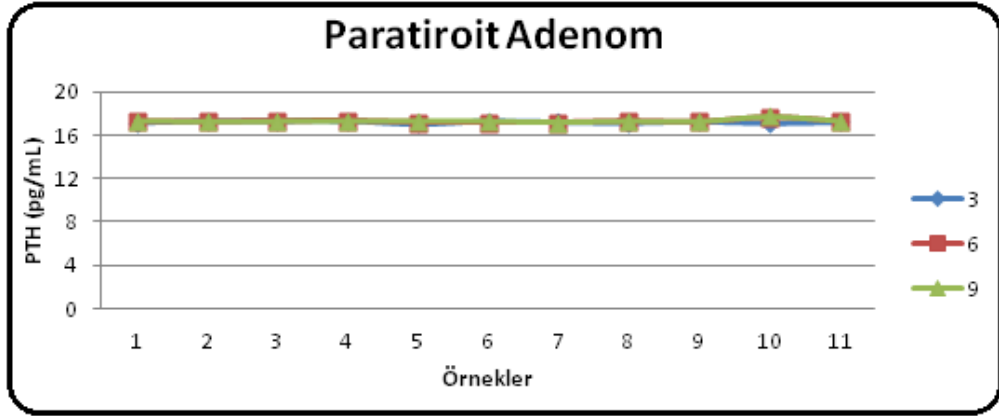
Paratiroid hiperplazi örneklerine ait kültürün 3., 6. ve 9. günlerinde toplanan süpernatantlara ait PTH değişimi Şekil 3.4’te verilmektedir. 33 örneğe ait ortalama PTH değeri 34pg/mL’dir. Tüm örneklerin birbirine yakın miktarda PTH üretmesi çalışmayı gerçekleştirdiğimiz paratiroid hiperplazi dokularının benzer histolojiye sahip olduklarını göstermektedir.



Şekil 3.4: Paratiroid hiperplazi dokularının kültürü sonucunda 3., 6. Ve 9. günlerde toplanan süpernatant örneklerine ait PTH değerlerinin değişimi (n=33 –her grup için n=11).

Paratiroid adenom örneklerine ait kültürün 3., 6. ve 9. günlerinde toplanan süpernatantlara ait PTH değişimi Şekil 3.5’te verilmektedir. 33 örneğe ait ortalama PTH değeri 17pg/mL’dir. Tüm örneklerin birbirine yakın miktarda PTH üretmesi

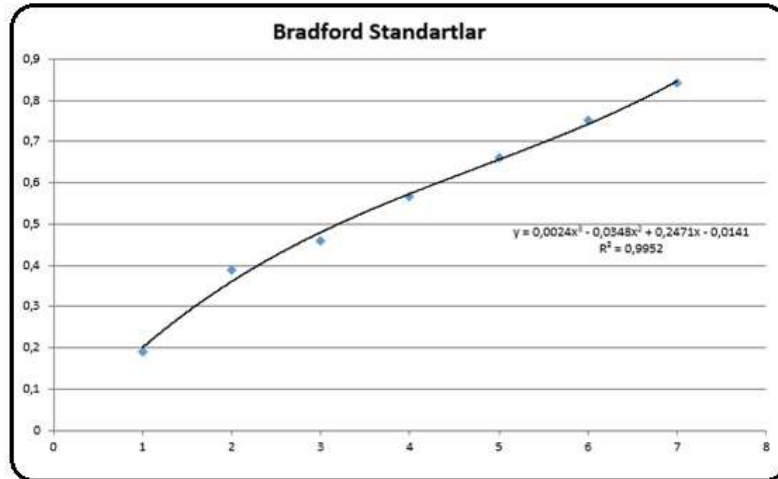
çalışmayı gerçekleştirdiğimiz paratiroid adenom dokularının benzer histolojiye sahip olduklarına işaret etmektedir.



Şekil 3.5: Paratiroid adenom dokularının kültürü sonucunda 3., 6. ve 9. günlerde toplanan süpernatant örneklerine ait PTH değerlerinin değişimi (n=33 –her grup için n=11).

3.1.4 Protein Kantitasyonu (Bradford)

HLA antijenlerinin araştırılacağı paratiroid hiperplazi ve adenom dokularının kültürlerinin 0, 3, 6 ve 9. günlerine ait 90 örneğin protein izolasyonu tamamlandı. Protein izolasyonları tamamlanan örneklerin kantitasyonları Bradford metodu ile Şekil 3.6'daki eğriye ait formül ile yapıldı. Örneklere ait protein konsantrasyonları tablo 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.6: Bradford metoduna göre yedi kademeli dilüsyonla gerçekleştirilen optik dansite değerlerine ait standart eğri grafiği ve 3.derece denklem.

Tablo 3.1:Paratiroid hiperplazi ve adenom doku hücrelerinin total protein konsantrasyonları (H:hiperplazi, A:adenom).

Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)
H3-1	36,917	H6-8	39,544	H0-4	36,465	A3-1	26,849	A9-1	21,426
H3-2	35,233	H6-9	34,994	H0-5	37,170	A3-2	25,055	A9-2	23,376
H3-3	36,943	H6-10	37,250	H0-6	36,979	A3-3	27,7221	A9-3	23,048
H3-4	36,222	H6-11	37,352	H0-7	37,594	A3-4	26,849	A9-4	22,978
H3-5	36,014	H9-1	34,708	H0-8	37,779	A3-5	27,078	A9-5	20,114
H3-6	6,737	H9-2	34,365	H0-9	37,001	A3-6	26,389	A9-6	23,158
H3-7	35,729	H9-3	35,259	H0-10	36,386	A3-7	27,306	A9-7	29,008
H3-8	37,173	H9-4	35,833	H0-11	37,563	A3-8	27,420	A9-8	22,047
H3-9	37,122	H9-5	38,064	A3-1	26,380	A3-9	26,676	A9-9	23,458
H3-10	36,351	H9-6	36,248	A0-2	26,389	A6-1	26,648	A0-1	22,657
H3-11	34,814	H9-7	37,937	A0-3	27,563	A6-2	24,645	A0-2	23,198
H6-1	36,789	H9-8	37,109	A0-4	24,908	A6-3	26,445	A0-3	24,890
H6-2	39,420	H9-9	38,311	A0-5	27,152	A6-4	26,706	A0-4	21,058
H6-3	41,752	H9-10	36,3631	A0-6	26,418	A6-5	23,376	A0-5	21,009
H6-4	35,937	H9-11	37,056	A0-7	26,820	A6-6	23,989	A0-6	23,490
H6-5	37,122	H0-1	37,016	A0-8	26,560	A6-7	23,938	A0-7	21,798
H6-6	37,148	H0-2	36,457	A0-9	26,590	A6-8	24,439	A0-8	22,223
H6-7	41,873	H0-3	36,541	A0-10	26,619	A6-9	24,368	A0-9	21,089

3.1.5 Total RNA izolasyonları ve cDNA sentezi

Paratiroid hiperplazi (n=30), adenom (n=10) ve sağlıklı (n=4) dokulara ait hücrelerden "*Roche high pure RNA isolation*" kit kullanılarak total RNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen RNA'ların nanodrop cihazı ile saflık ve konsantrasyon tayinleri tamamlandı (Tablo 3.2). Saflık tayini sonrası A260/A280 oranı 1,6-2,1 aralığında olan RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi.

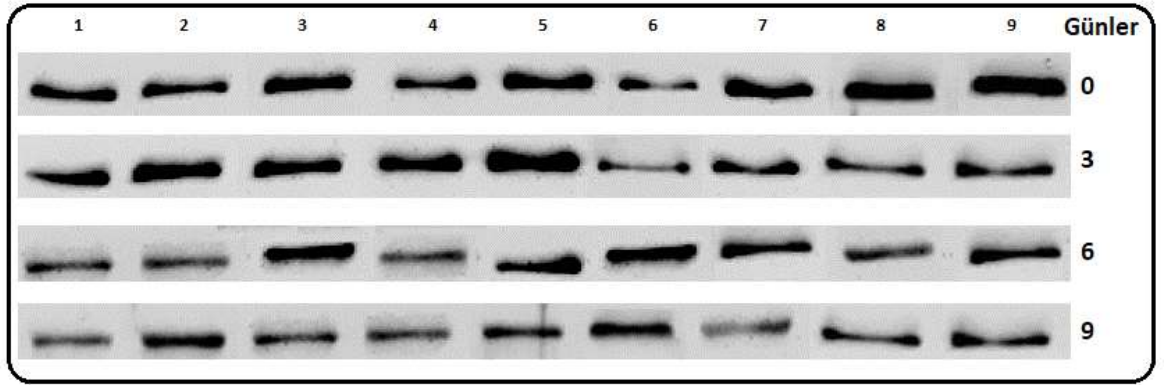
Tablo 3.2: Paratiroid Hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait hücrelerin total RNA saflıkları (H:hiperplazi, A:adenom, S:sağlıklı).

Örnekler	A260/A280 oranı	Örnekler	A260/A280 oranı	Örnekler	A260/A280 oranı
H0-1	2,02	H3-9	1,58	H9-7	1,99
H0-2	1,93	H3-10	1,63	H9-8	2,03
H0-3	2,05	H6-1	1,68	H9-9	2,0
H0-4	2,12	H6-2	2,05	H9-10	1,97
H0-5	2,13	H6-3	2,01	A0-1	1,89
H0-6	2,04	H6-4	1,99	A0-2	1,88
H07	2,01	H6-5	2,02	A0-3	2,09
H0-8	2,09	H6-6	2,01	A0-4	2,04
H0-9	1,98	H6-7	2,01	A0-5	1,94
H0-10	1,93	H6-8	1,93	A0-6	1,96
H3-1	1,77	H6-9	1,79	A0-7	1,88
H3-2	1,96	H6-10	1,81	A0-8	1,69
H3-3	2,01	H9-1	1,93	A0-9	1,73
H3-4	2,09	H9-2	1,94	A0-10	1,99
H3-5	1,97	H9-3	1,77	S1	2,03
H3-6	1,98	H9-4	1,86	S2	2,1
H3-7	1,46	H9-5	2,07	S3	1,94
H3-8	2,06	H9-6	2,11	S4	1,99

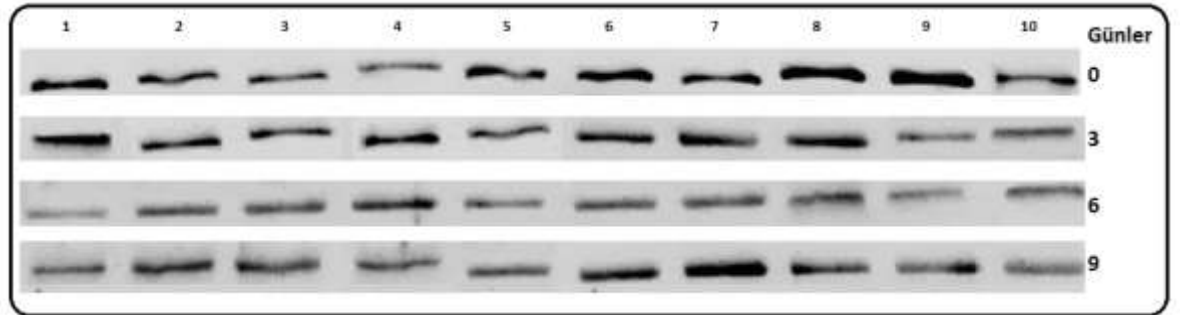
Total RNA örneklerinden *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri ile erime sıcaklığı (T_m) değerleri belirlenerek optimize edilen koşullarda qRT-PZR işlemi gerçekleştirildi.

3.1.6 Housekeeping Protein Beta-aktin Ekspresyonu

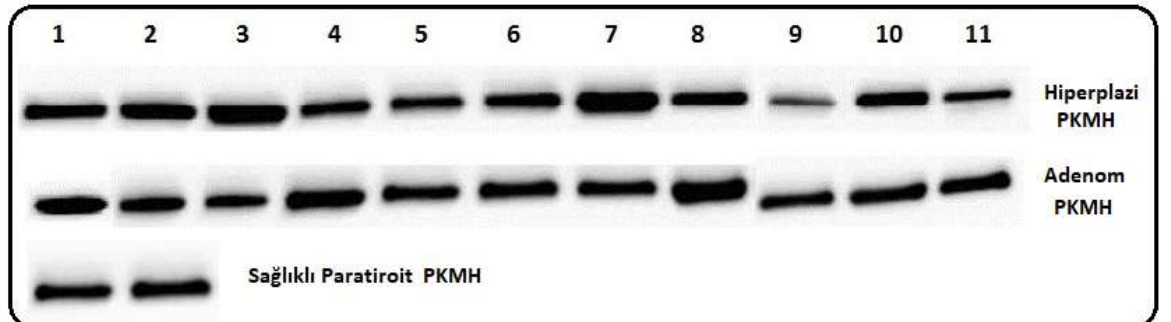
Beta-aktin *housekeeping* proteini, HLA antijenlerinin araştırıldığı 90 örnek (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8)ve MiHa Sp110 peptidinin araştırıldığı 42 örneğe (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10) ait proteinlerde ekspresyonları kemilüminesan görüntüleme sonucunda elde edilen veriler sunulmaktadır. Tüm proteinler SDS-PAGE jel elektroforezinde 30µg yüklenmiştir.



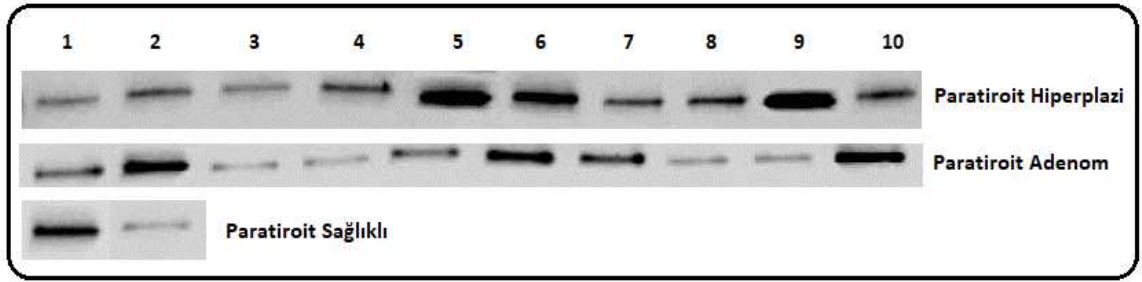
Şekil 3.7: Paratiroid adenom örneklerinin *housekeeping* protein beta-aktin değişimi



Şekil 3.8: Paratiroid hiperplazi örneklerinin *housekeeping* protein beta-aktin değişimi.



Şekil 3.9: Paratiroid hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait PKMH örneklerinin *housekeeping* protein beta-aktin değişimi.



Şekil 3.10: Paratiroit hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait *housekeeping* protein beta-aktin değişimi.

3.1.7 HLA-Sınıf I Antijenlerinin Ekspresyonları

Konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenen total proteinler; SDS-PAGE jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılması için 4x laemmli tampon kullanılarak final konsantrasyonu 30µg/mL olacak şekilde yüklendi.

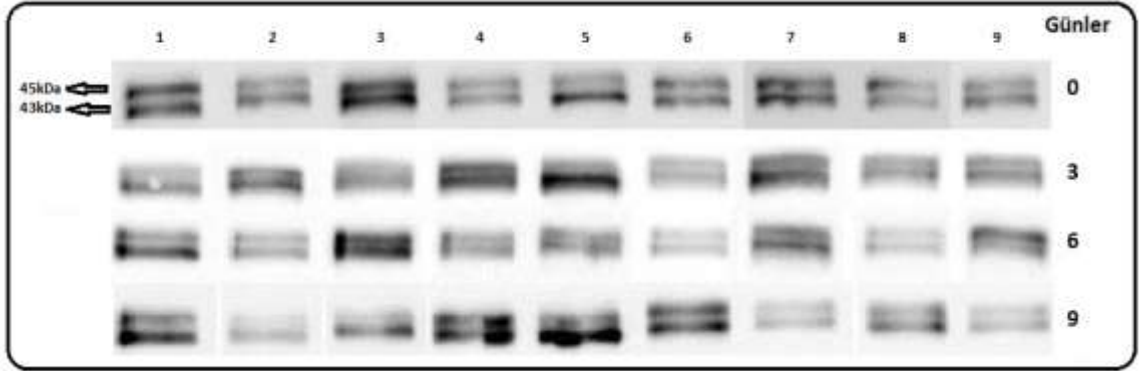
HLA-sınıf I antijenlerinin protein ekspresyonlarında; HLA-A için %4-17'lik, HLA-B ve -C için %4-12'lik SDS-PAGE jel kullanıldı. Jelde ayrışması sağlanan protein örneklerinin PVDF membran transferi yarı kuru sistemle tamamlandı. Transfer aşamasını takiben bloklama, primer ve sekonder anitkor muamelesi ve kemilüminesan görüntüleme yapıldı. Elde edilen görseller, ImageJ analiz programında analiz edilerek beta-aktin sonuçlarına göre rölatif dansite değerleri ile istatistiksel analizleri tamamlandı.

HLA-A protein ekspresyon değişimi; paratiroit hiperplazi dokularında Şekil 3.11'de ve paratiroit adenom dokularında Şekil 3.12'de gösterilmektedir.

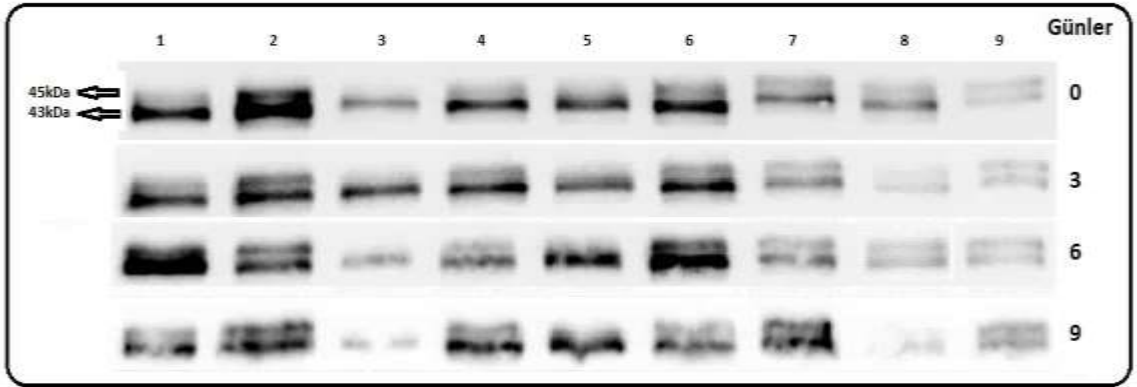
HLA-B protein ekspresyon değişimi; paratiroit hiperplazi dokularında Şekil 3.13'de ve paratiroit adenom dokularında Şekil 3.14'de gösterilmektedir.

HLA-C protein ekspresyon değişimi; paratiroit hiperplazi dokularında Şekil 3.15'de ve paratiroit adenom dokularında Şekil 3.16'de gösterilmektedir.

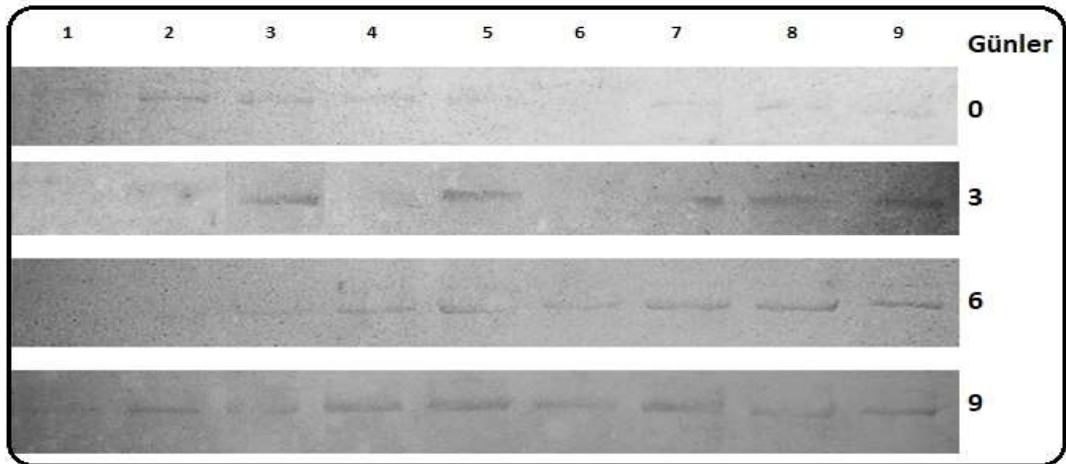
HLA-sınıf I antijenleri HLA-A ve -B gen ekspresyonu analizinde, enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin kültüre edilmesiyle total RNA izolasyonları tamamlandı ve cDNA eldesi sonrası qRT-PZR ile kantitatif analizi yapıldı. Sonuçlar *cycle of treshold* (CT) verileri ile $\Delta\Delta Ct$ formülü kullanılarak değerlendirildi.



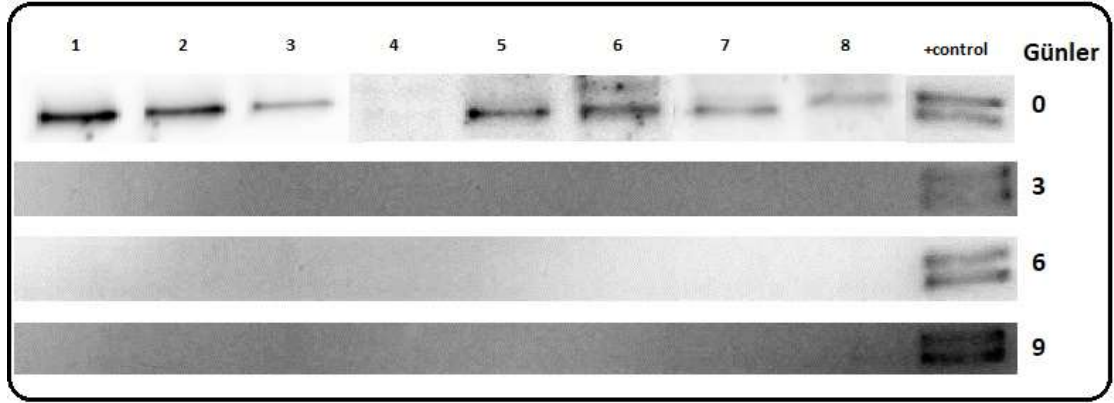
Şekil 3.11: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-A antijeni değişimi (n=9).



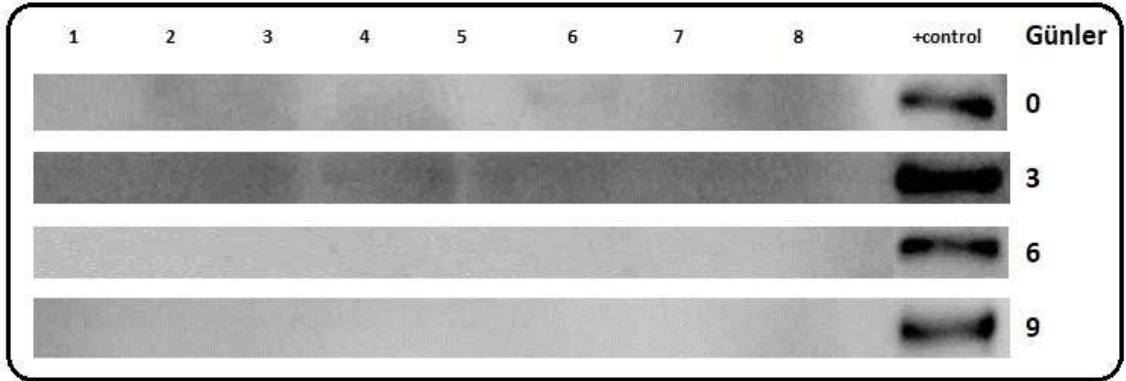
Şekil 3.12: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-A antijeni değişimi (n=9).



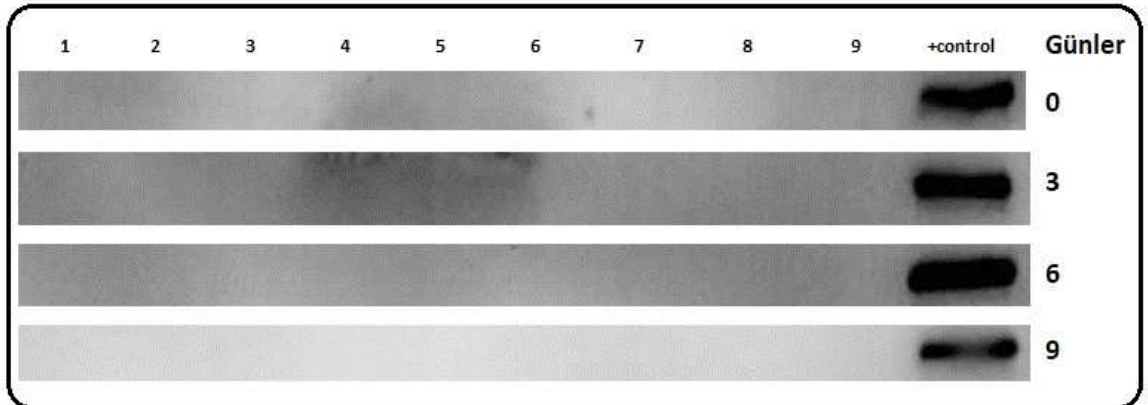
Şekil 3.13: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin, kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-B antijeni değişimi (n=9).



Şekil 3.14: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-B antijeni değişimi (n=9).



Şekil 3.15: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-C antijeni değişimi (n=9).



Şekil 3.16: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-C antijeni değişimi (n=9).

3.1.8 HLA-Sınıf II Antijenlerinin Ekspresyonları

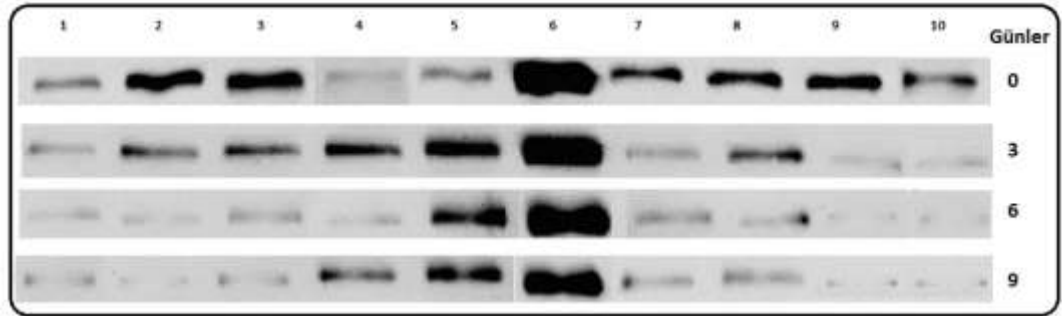
Konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenen total proteinler; SDS-PAGE jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılması için 4x laemmli tampon kullanılarak final konsantrasyonu 30µg olacak şekilde yüklendi.

HLA-sınıf II antijenlerinin protein ekspresyonlarında; HLA-DR, -DP ve -DQ α 1, -DQ α 2 için %4-12'lik SDS-PAGE jel kullanıldı. Jelde ayrışması sağlanan protein örneklerinin PVDF membran transferi yarı kuru sistemle tamamlandı. Transfer aşamasını takiben bloklama, primer ve sekonder anitkor muamelesi ve kemilüminesan görüntüleme yapıldı. Elde edilen western blot sonuçları, ImageJ analiz programında analiz edilerek beta-aktin sonuçlarına göre rölatif dansite değerleri ile istatistiksel analizleri tamamlandı.

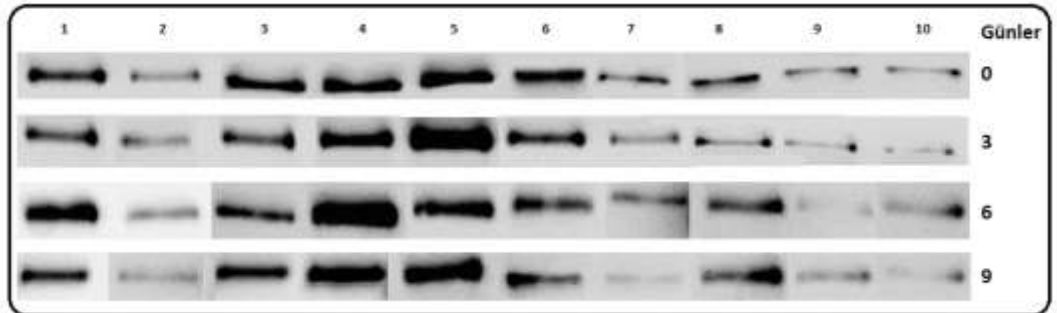
Gen ekspresyonlarının analizinde, HLA-sınıf II antijenlerinden; HLA-DR, -DQ enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin kültüre edilmesiyle total RNA izolasyonları tamamlandı ve cDNA eldesi sonrası qRT-PZR ile kantitatif analizi yapıldı. Sonuçlar CT verileri ile $\Delta\Delta C_t$ formülü kullanılarak değerlendirildi.

3.1.8.1 HLA-DR Protein Ekspresyonları

Paratiroid hiperplazi ve adenom dokularının ekspresyon analizinde elde edilen HLA-DR değişimi sırasıyla Şekil 3.17 ve 3. 18'de verilmektedir.



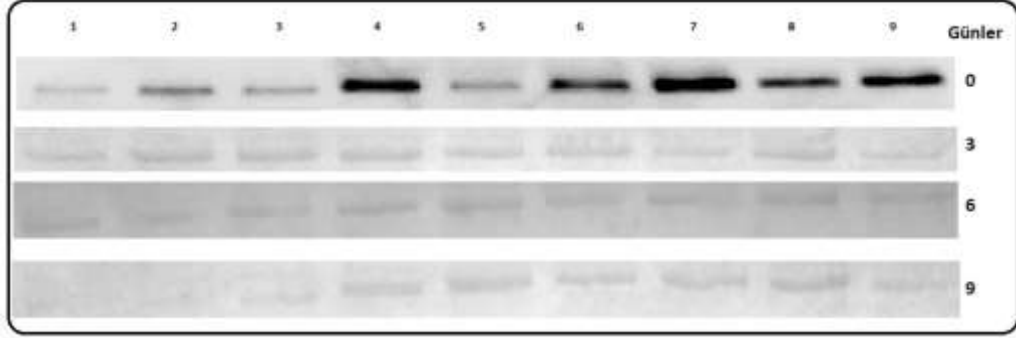
Şekil 3.17: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DR antijeni değişimi (n=10).



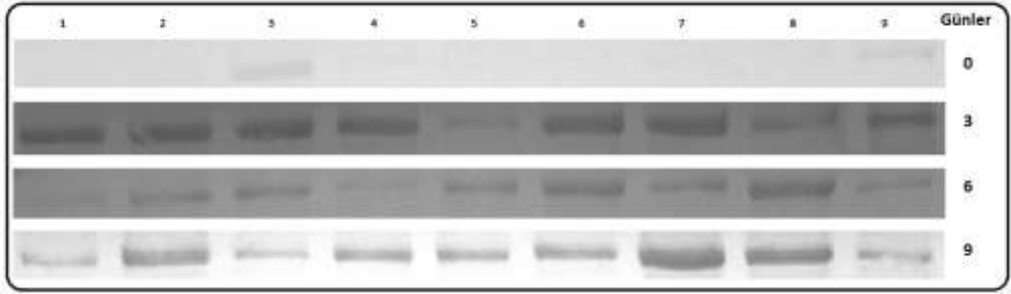
Şekil 3.18: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DR antijeni değişimi (n=10).

3.1.8.2 HLA-DP Protein Ekspresyonları

Paratiroid hiperplazi ve adenom dokularının protein ekspresyon analizinde elde edilen HLA-DP değişimi sırasıyla Şekil 3.19 ve 3.20’de verilmektedir.



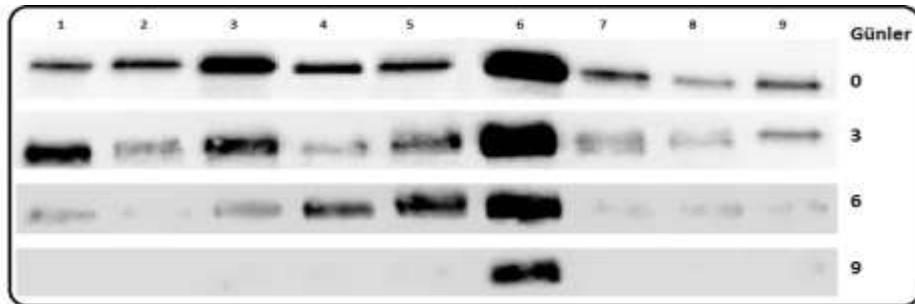
Şekil 3.19: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DP antijeni değişimi (n=9).



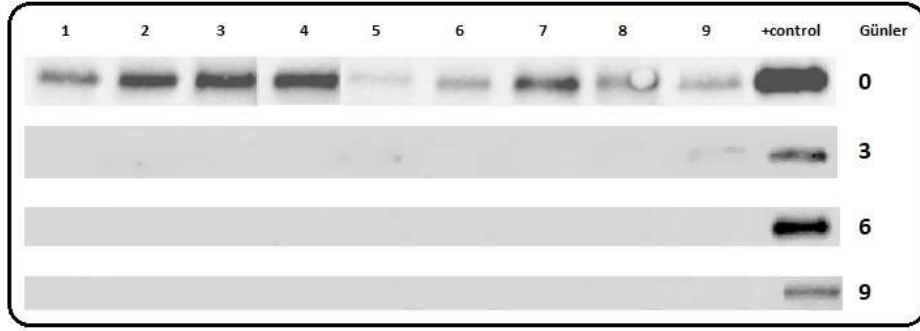
Şekil 3.20: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DP antijeni değişimi (n=9).

3.1.8.3 HLA-DQα1 ve –DQα2 Protein Ekspresyonları

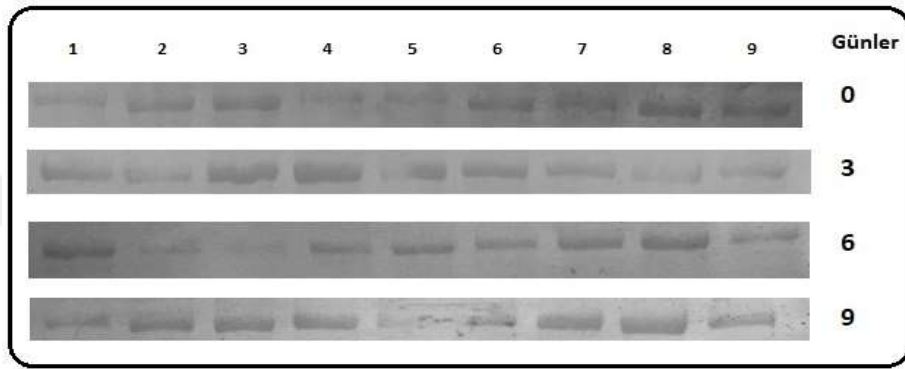
Paratiroid hiperplazi ve adenom dokularının protein ekspresyon analizinde elde edilen HLA-DQα1 değişimi; paratiroid hiperplazi dokularında Şekil 3.21’de ve paratiroid adenom dokularında Şekil 3.22’de gösterilmektedir. HLA-DQα2 değişimi; paratiroid hiperplazi dokularında Şekil 3.23’de ve paratiroid adenom dokularında Şekil 3.24’de gösterilmektedir.



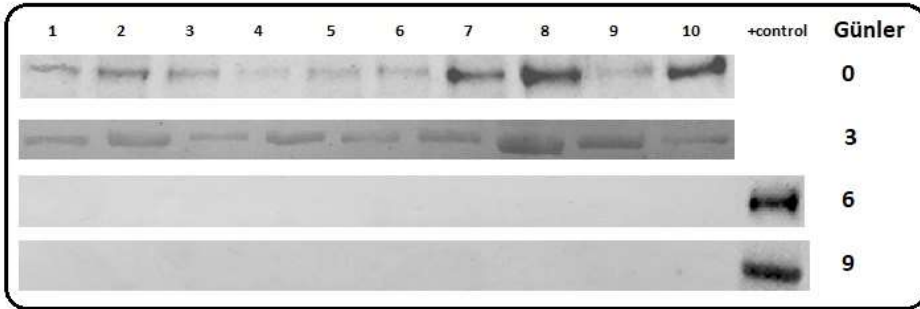
Şekil 3.21: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DQα1 antijeni değişimi (n=9).



Şekil 3.22: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DQ α 1 antijeni değişimi (n=9).



Şekil 3.23: Paratiroid hiperplazi dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DQ α 2 antijeni değişimi (n=9).



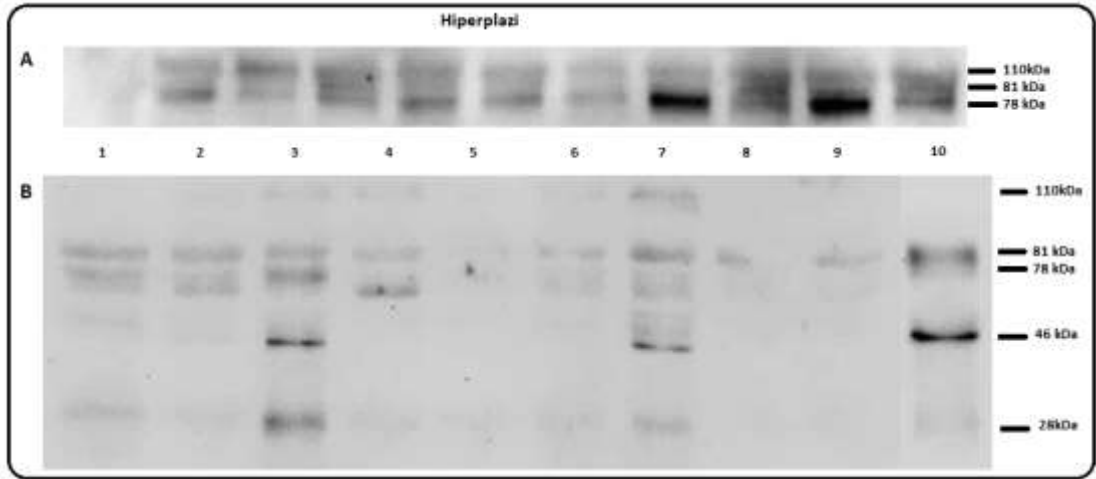
Şekil 3.24: Paratiroid adenom dokularına ait hücrelerin; kültürün 0, 3, 6, 9. günlerindeki HLA-DQ α 2 antijeni değişimi (n=9).

3.1.9 Sağlıklı Paratiroid Dokularının HLA-Sınıf I ve II Gen Ekspresyonları

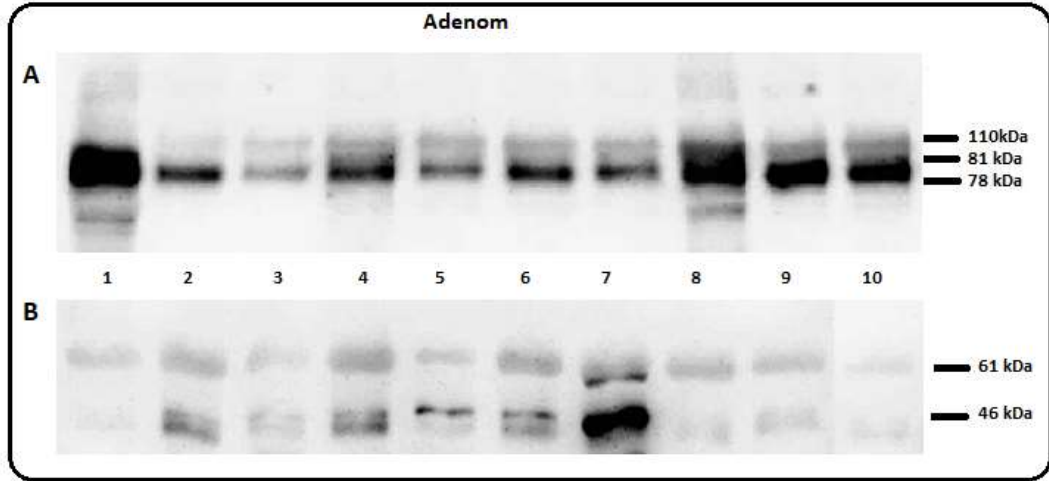
Sağlıklı paratiroid dokularının gen ekspresyonlarının analizinde, HLA-sınıf I antijenlerinden; HLA-A, -B ve HLA-sınıf II antijenlerinden; HLA-DR, -DQ değişimleri araştırıldı. Enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin kültüre edilmesiyle total RNA izolasyonları tamamlandı ve cDNA eldesi sonrası qRT-PZR ile kantitatif analizi yapıldı. Sonuçlar CT verileri ile $\Delta\Delta C_t$ formülü kullanılarak değerlendirildi.

3.1.10 MiHa SP110 Peptit Protein Ekspresyonları

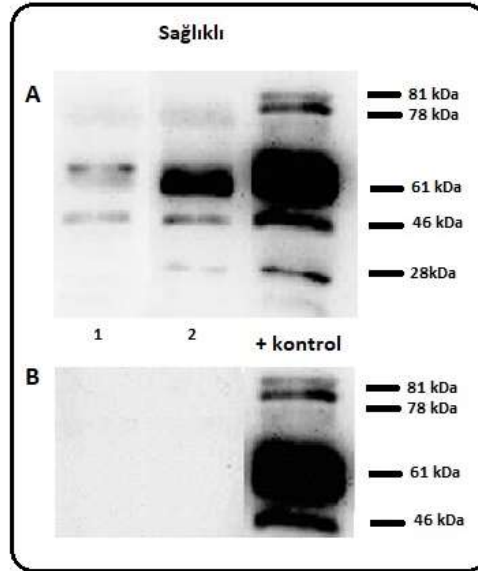
Konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenen PKMH örneklerine ait total proteinler; %4-12'lik SDS-PAGE jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılması için 2x laemmlı tampon kullanılarak final konsantrasyonu 50µg/mL olacak şekilde yüklendi. Aynı şekilde paratiroid hiperplazi, adenom ve sağlıklı dokulara ait nükleolar protein örneklerinin konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlendikten sonra %4-17'lik SDS-PAGE jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılması için 2x laemmlı tampon kullanılarak final konsantrasyonu 100µg/mL olacak şekilde yüklendi. Jelde ayrışması sağlanan total ve nükleolar protein örneklerinin PVDF membran transferi yarı kuru sistemle tamamlandı. Transfer aşamasını takiben bloklama, primer ve sekonder antikor muamelesi ve kemilüminesan görüntüleme yapıldı. SP110 ekspresyonları; paratiroid hiperplazi Şekil 3.25'de, paratiroid adenom Şekil 3.26'da ve paratiroid sağlıklı Şekil 3.27'de dokulara ait değişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.25: Paratiroid hiperplazi dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları. A;PKMH protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-12'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir. B; 100µg/mL protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-17'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir.



Şekil 3.26: Paratiroid adenom dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları. A;PKMH protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-12'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir. B; 100µg/mL protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-17'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir.



Şekil 3.27: Sağlıklı paratiroid dokuları ve PKMH'lerine ait SP110 peptit ekspresyonları. A;PKMH protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-12'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir. B; 100µg/mL protein örneklerinin SP110 peptit ekspresyonları %4-17'lik SDS-PAGE jel elektroforezi ve western blotlama sonrası elde edilmiştir.

3.2 Tartışma

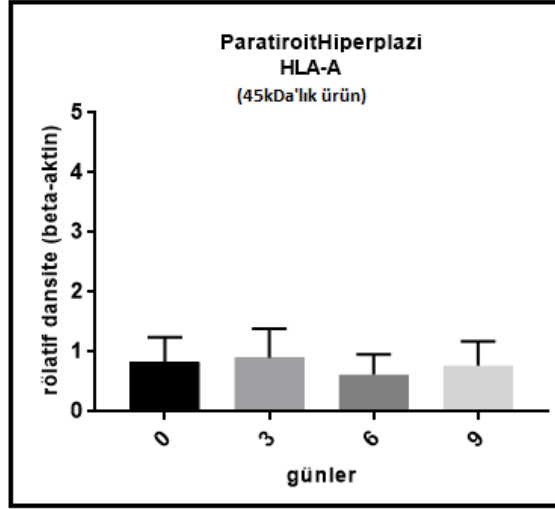
3.2.1 HLA Sınıf I Ekspresyonları Analizi

3.2.1.1 HLA-A

Paratiroid hiperplazi (Şekil 3.28) ve adenom (Şekil 3.29) dokularının protein ekspresyon analizinde elde edilen HLA-A 45 ve 43 kDa'lık ürünlerin değişimi, rölatif dansite oranına (beta-aktin) göre değerlendirildi. *Outlier* örnek; protein izolasyonu, western blotlama gibi aşamalarda oluşabilecek hatalar nedeniyle ekspresyon sonuçlarının ortalamasından en çok sapma gösteren örneklerden seçildi ve örnekler western blotlama görsel sonuçlarından çıkarıldı.

Sınıf I antijenlerinin klasik yapısı düşünüldüğünde; transmembran domaini tek heliks dönüşü ile $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ domainlerinden oluşan ağır zincir yapısından oluştuğu bilinmektedir [100]. HLA-A antijeni 341 a.a. uzunluğunda bir proteindir. $\beta 2$ mikroglobulin molekülünün kovalent etkileşimiyle hücre membranında heterodimer bir yapıda bulunur. Ağır zincir transmembran bir bölge içerir. Yaklaşık 45kDa büyüklüğündedir. Paratiroid hiperplazi ve adenom dokularında kültüre edilen günlerde kullanılan total proteinlere ait ekspresyonları Şekil 3.11 ve 3.12'de görüldüğü gibi dimer yapısında bulunmaktadır. 45kDa büyüklüğündeki yapının membrana yerleşim gösteren 3 α domainine işaret ettiği düşünülmektedir. Sınıf I moleküllerinin hücre membranına yerleşim gösterme aşaması [135] ve endoplazmik retikulum yüzeyinden vezikül içerisinde, membrana yerleşiminin tamamlanması gerektiği bilinmektedir [136]. Burada elde edilmiş yaklaşık 43kDa'luk bantların, endoplazmik retikulum içerisinde, katlanma sürecinde olan HLA-A proteinleri olduğu tahmin edilmektedir.

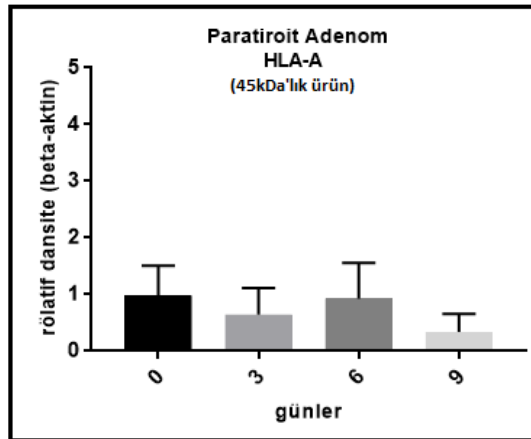
HLA-A 45kDa'luk ürünün; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.28) kültüre edilen hücrelerde, protein ekspresyonlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,4839$).



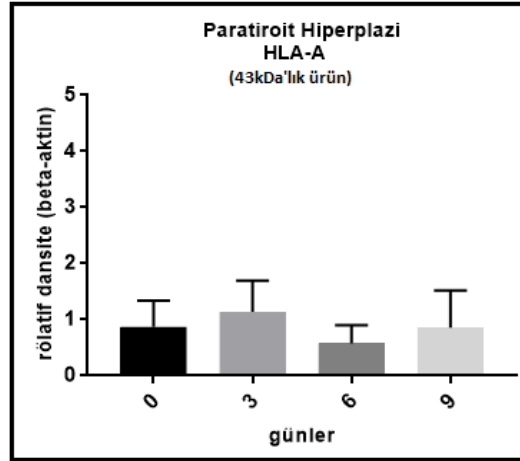
Şekil 3.28: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-A 45kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,4839).

Aynı şekilde adenom dokusunda (Şekil 3.29) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,0581).

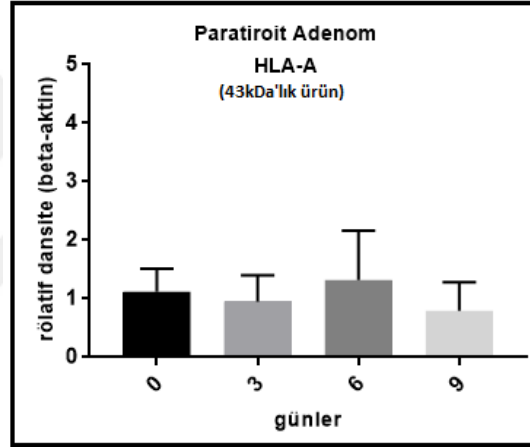
HLA-A 43kDa'lık ürünün hiperplazi dokusunda (Şekil 3.30) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,1463). Aynı şekilde adenom dokusunda (Şekil 3.31) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,2399).



Şekil 3.29: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-A 45kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,0581).

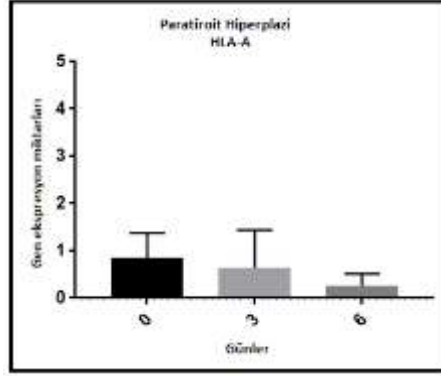


Şekil 3.30: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-A 43kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri ($p=0,1463$).



Şekil 3.31: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-A 43kDa'lık ürünün beta-aktine göre rölatif dansite değerleri ($p=0,2399$).

HLA-A gen ekspresyonunun analizinde, paratiroid hiperplazi örneklerinin, kültüre edildikleri günlere göre gen ekspresyonlarının değişimi Şekil 3.32'de gösterilmiştir. Kültürün sıfır gününden itibaren altıncı gününe doğru gen ekspresyon seviyesinin azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0146$).



Şekil 3.32: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6. günlerindeki HLA-A gen ekspresyonunun değişimi (p=0,0146).

HLA-A; 45kDa ve 43kDa büyüklüğündeki iki dimer yapısının paratiroid hiperplazi dokularında birlikte veya bağımsız olarak incelendiğinde sonucun değişmediği belirlenmiştir. Gen ekspresyonlarındaki 0. günden, 6. güne doğru gözlenen azalış, protein seviyesinin kültürün 9. gününe kadar değişmediği gözlenmiştir. Protein analizleriyle, gen ekspresyonları değerleri arasındaki farklı sonuçlar, bu ve benzeri çalışmalarda “sadece gen” ya da “sadece protein” analizinin hatalı sonuçlara neden olabileceğini göstermiştir.

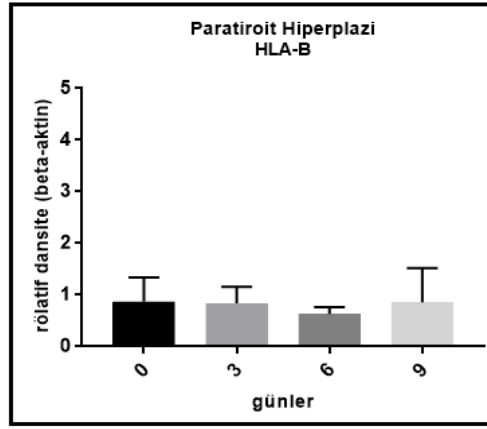
3.2.1.2 HLA-B

Paratiroid hiperplazi dokularının ekspresyon analizinde elde edilen HLA-B değişimi, rölatif dansite oranına (beta-aktin) göre değerlendirilmiştir. *Outlier* örnek; protein izolasyonu, western blotlama gibi aşamalarda oluşabilecek hatalar nedeniyle ekspresyon sonuçlarının ortalamasından en çok sapma gösteren örneklerden seçilmiştir ve örnekler western blotlama görsel sonuçlarından çıkarılmıştır.

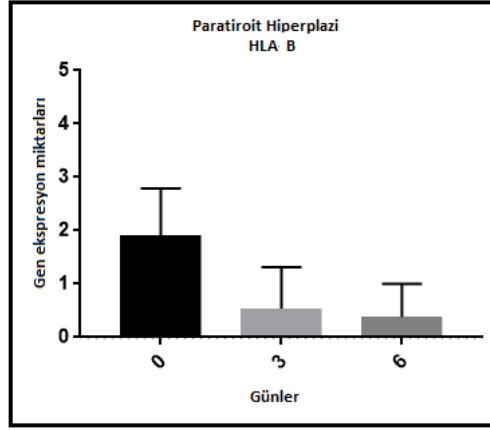
HLA-B antijeni 362 a.a. uzunluğunda bir proteindir. Ağır zincir transmembran bölgeyi içerir ve yaklaşık 45kDa büyüklüğündedir. HLA-B; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.33) kültüre edilen hücrelerdeki protein ekspresyonlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0005). HLA-B; paratiroid adenom dokusunda (Şekil 3.14) kültüre edildikçe 0. günden sonra 30µg/mL protein örneğinden kemilüminesan görüntüleme sonucunda veri elde edilememiştir. Western blotlama deneyinde SDS-PAGE jel elektroforezinde pozitif kontrol olarak PKMH örneği kullanılmıştır.

HLA-B gen ekspresyonunun analizinde, paratiroid hiperplazi örneklerinin, kültüre edildikleri günlere göre gen ekspresyonlarının değişimi Şekil 3.34’de gösterilmiştir. Kültürün sıfır gününden itibaren altıncı gününe doğru istatistiksel olarak anlamlı şekilde gen ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir ($p=0,0125$). Gen ekspresyonlarındaki 0. günden, 6. güne doğru gözlenen azalış, protein seviyesinin kültürün 9. gününe kadar değişmediği gözlenmiştir. Protein analizleriyle, gen ekspresyonları değerleri arasındaki farklı sonuçlar, bu ve benzeri çalışmalarda “sadece gen” ya da “sadece protein” analizinin hatalı sonuçlara neden olabileceğini göstermiştir.

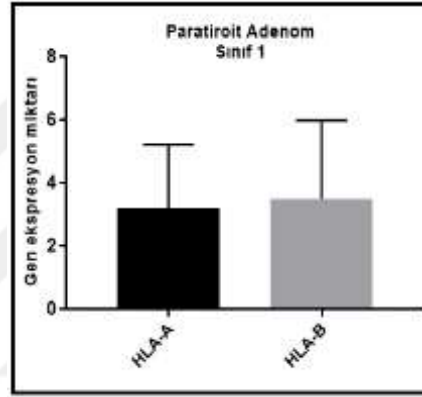
Paratiroid adenom örneklerinin, kültürün sıfır günündeki verilerinin HLA sınıf 1 gen ekspresyon seviyeleri açısından değişimi Şekil 3.35’de gösterilmiştir. Hücre izolasyonlarının tamamlanmasını takiben elde edilen total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi ile yapılan qRT-PZR kantitasyon verileri sınıf 1 açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p=0,8243$).



Şekil 3.33: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-B antijeninin beta-aktine göre relatif dansite değerleri ($p=0,0005$).



Şekil 3.34: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6. günlerindeki HLA-B gen ekspresyonunun değişimi (p=0,0125).



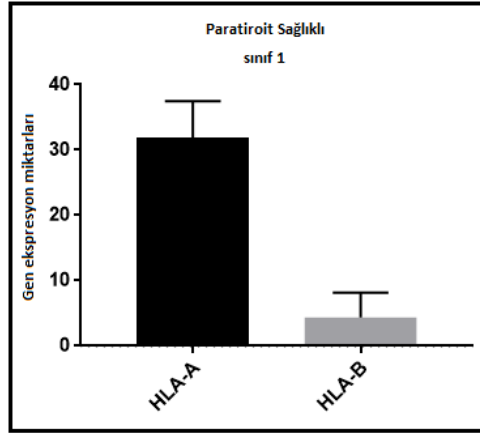
Şekil 3.35: Paratiroid adenom dokularlarının sınıf 1 antijenleri HLA-A ve -B açısından gen ekspresyonlarının değişimi (p=0,8243).

3.2.1.3 HLA-C Ekspresyonları

HLA-C; paratiroid adenoma ve hiperplazi dokularında (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16) her örnek için yüklenen 30µg/mL protein örneğinden kemilüminesan görüntüleme sonucunda veri elde edilememiştir. Western blotlama deneyinde SDS-PAGE jel elektroforezinde pozitif kontrol olarak PKMH örneği kullanılmıştır.

3.2.2 Sağlıklı paratiroid dokusunun HLA-sınıf I gen ekspresyonları analizi

Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf I antijenlerinden HLA-A'nın HLA-B'ye göre gen ekspresyonundaki (Şekil 3.36) artış istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (p=0,0002).

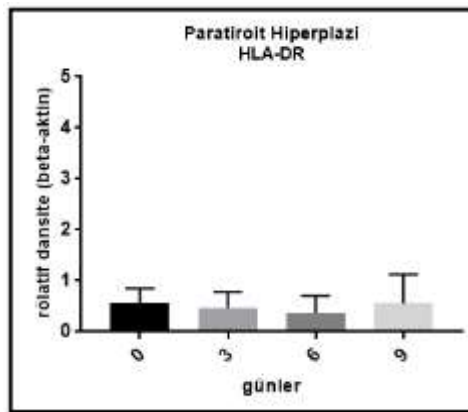


Şekil 3.36: Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf I antijenlerinden HLA-A ve -B antijenlerinin gen ekspresyonunun değişimi (p=0,0002).

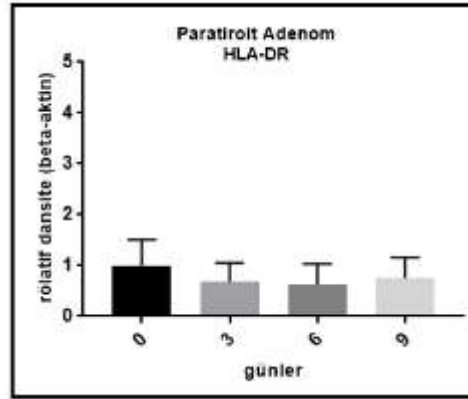
3.2.3 HLA Sınıf II Ekspresyonları Analizi

3.2.3.1 HLA-DR

HLA-DR antijeni 254a.a. uzunluğunda α ve β zincirinden oluşan heterodimer bir yapıda bir proteindir. α zinciri 33-35 kDa ve β zinciri ise 26-28 kDa büyüklüğündedir. HLA-DR; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.37) kültüre edilen hücrelerde protein ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,6759). HLA-DR; paratiroid adenom dokusunda (Şekil 3.38) kültüre edilen hücrelerdeki protein ekspresyon değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,2634).

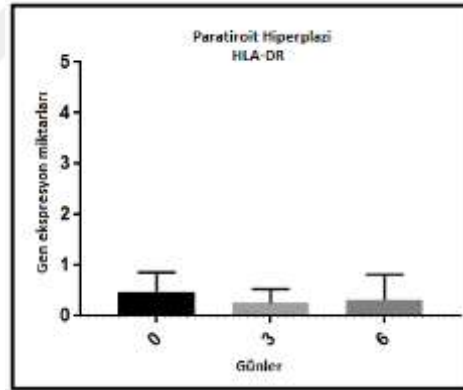


Şekil 3.37: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DR antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,6759).



Şekil 3.38: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9 günlerinde HLA-DR antijeninin beta-aktine göre rölaf dansite değerleri (p=0,2634).

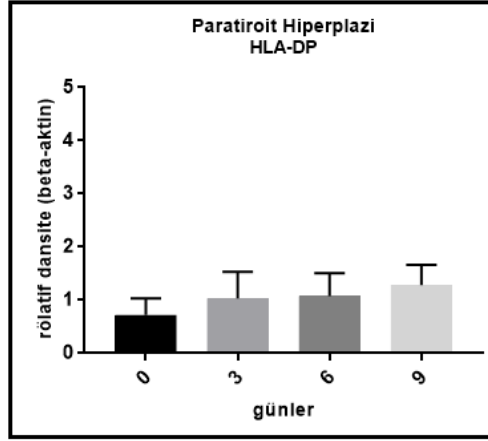
Paratiroid hiperplazi örneklerinin, kültüre edildikleri günlere göre gen ekspresyonlarının değişimi Şekil 3.39’da gösterilmiştir. Kültürün sıfır gününden itibaren altıncı gününe doğru HLA-DR gen ekspresyonlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,6211).



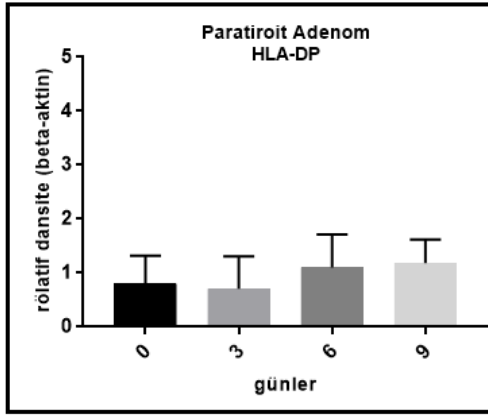
Şekil 3.39: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6.günlerindeki HLA-DR gen ekspresyonunun değişimi (p=0,6211)

3.2.3.2 HLA-DP

HLA-DP antijeni 260a.a. uzunluğunda α ve β zincirinden oluşan heterodimer yapıda ve α zinciri 33-35 kDa, β zinciri ise 26-28 kDa büyüklüğündedir. HLA-DP; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.40) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesinde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0451). HLA-DP; paratiroid adenom dokusunda (Şekil 3.41) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,2382).



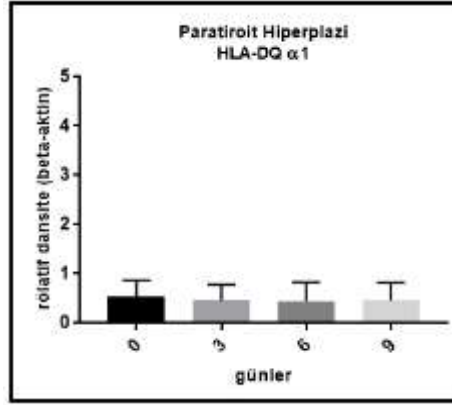
Şekil 3.40: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DP antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,0451)



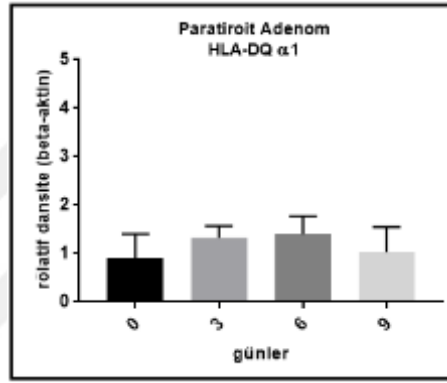
Şekil 3.41: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9. günlerindeki HLA-DP antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,2382)

3.2.3.3 HLA-DQ

HLA-DQ antijeni 254a.a. uzunluğunda α ve β zincirinden oluşan heterodimer yapıda ve α zinciri 33-35 kDa, β zinciri ise 26-28 kDa büyüklüğündedir. HLA-DQ α 1; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.42) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,9572). HLA-DQ α 1; adenom dokusunda (Şekil 3.43) kültüre edilen hücrelerde hücrelerde protein seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,0616).

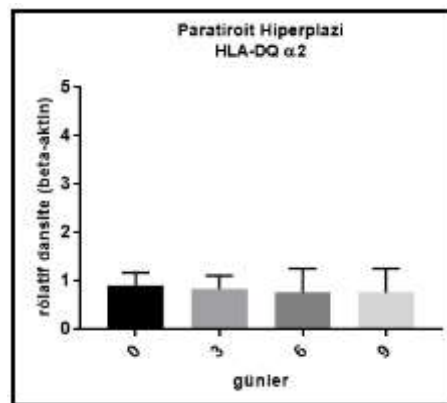


Şekil 3.42: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 1 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,9572).

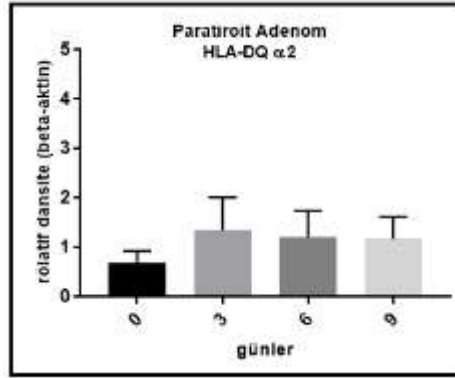


Şekil 3.43: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 1 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,0616).

HLA-DQ α 2; hiperplazi dokusunda (Şekil 3.44) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,8118). HLA-DQ α 2; adenom dokusunda (Şekil 3.45) kültüre edilen hücrelerde protein seviyesindeki artış kültürün 0. gününden itibaren 9. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,042).



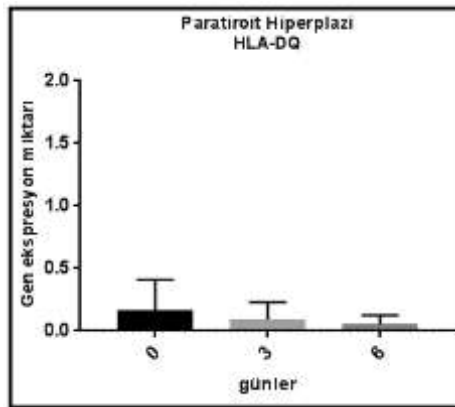
Şekil 3.44: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQ α 2 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,8118).



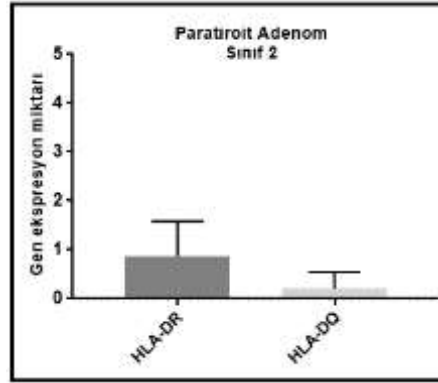
Şekil 3.45: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0,3,6,9.günlerindeki HLA-DQα1 antijeninin beta-aktine göre rölatif dansite değerleri (p=0,042).

Paratiroid hiperplazi örneklerinin, kültüre edildikleri günlere göre gen ekspresyonlarının değişimi Şekil 3.46’da gösterilmiştir. Kültürün sıfır gününden itibaren altıncı gününe doğru HLA-DQ gen ekspresyonlarında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0311). Gen ekspresyonlarındaki 0. günden 6. güne doğru gözlenen azalış, protein seviyesinin kültürün 9. gününe kadar değişmediği gözlenmiştir. Protein analizleriyle, gen ekspresyonları değerleri arasındaki farklı sonuçlar, bu ve benzeri çalışmalarda “sadece gen” ya da “sadece protein” analizinin hatalı sonuçlara neden olabileceğini göstermiştir.

Paratiroid adenom örneklerinin, 0. günlerine ait HLA-DR ve –DQ gen ekspresyonlarının değişimi Şekil 3.47’da gösterilmiştir. Kültürün sıfırında HLA-DR ekspresyonları HLA-DQ gen ekspresyonundan daha yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0286).



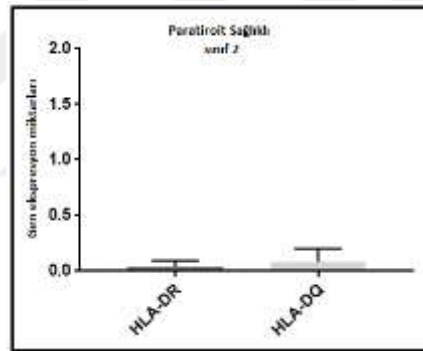
Şekil 3.46: Paratiroid hiperplazi dokusunda kültürün 0,3,6.günlerindeki HLA-DQ gen ekspresyonunun değişimi (p=0,0310).



Şekil 3.47: Paratiroid adenom dokusunda kültürün 0.günlerindeki HLA-DR ve -DQ antijenlerinin gen ekspresyonunun değişimi ($p=0,0286$).

3.2.4 Sağlıklı paratiroid dokusunun HLA-sınıf II gen ekspresyonları analizi

Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf II antijenlerinden HLA-DR ve HLA-DQ antijenlerinin gen ekspresyonları (Şekil 3.48) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,6242$).



Şekil 3.48: Sağlıklı paratiroid dokusunda sınıf II antijenlerinden HLA-DR ve -DQ antijenlerinin gen ekspresyonunun karşılaştırılması (t test, $p=0,6242$).

3.2.5 Paratiroid dokularında SP110 peptit varlığı

Elde edilen verilerde 10 hiperplazik paratiroid dokusunda izoformlardan (100µg protein varlığında); 81kDa'lık ürünün 7 dokuda pozitif olduğu, 78kDa'lık ürünün 5 dokuda, 46kDa'lık ürünün 3 dokuda ve 26kDa'lık ürünün 4 dokuda pozitif olduğu görülmüştür. Kullanılan dokulara ait her bireyin PKMH SP110 açısından pozitif olduğu bilinmektedir.

Elde edilen verilerde 10 adenomatöz paratiroid dokusunda izoformlardan (100µg protein varlığında); 61 ve 46 kDa'lık ürünlerin her dokuda pozitif olduğu gösterilmiştir. Kullanılan dokulara ait her bireyin PKMH SP110 açısından pozitif olduğu bilinmektedir.

Elde edilen verilerde 2 sağlıklı paratiroid dokusunda izoformlardan(100µg protein varlığında); veri elde edilememiştir. Kullanılan dokulara ait her bireyin PKMH SP110 açısından pozitif olduğu bilinmektedir.



4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Solid organ nakillerinde, immün ret yanıtı doğal ve edinsel bağışıklık arasındaki koordinasyon sayesinde meydana gelmektedir. İmmün sistemin bu süreci, T hücrelerinin etkinliği ile başlatıp yönlendirdiği bilinmektedir. Bir alıcıya ait T hücreler aktive olduktan sonra, klonal çoğalmaya yönelenrek efektör hücrelere dönüşürler. Migrasyon ile efektör T hücreleri, nakledilen dokuya yönelir ve doku harabiyetini gerçekleştirirler. CD4 T lenfositler B lenfositlerinin allo-antikor salınımını da indükleyerek yanıtı daha hızlı oluşturabilmektedir [119, 137].

Bütün bu aktivasyon ve yanıtın oluşabilmesi HLA ve MiHa antijenlerinin varlığına bağlıdır. 6. kromozondan kodlanan HLA sınıf I ve II molekülleri, T hücrelerinin yüzeyinde bulunan T hücre reseptörü (TCR) ile bağlanarak sunumu tamamlar. CD8+ T hücreler HLA sınıf I, CD4+ T hücreler HLA sınıf II moleküllerine bağlanırlar [126, 137].

Olgunlaşmamış T lenfositler dolaşıma dahil olmadan önce; timus “self-peptit”lere düşük afinite ile bağlandığı ve yanıt geliştirmedeği zaman bu hücreleri dolaşıma dahil eder. Buradaki seçim sürecinde T hücrelerinin “self-peptit”lere düşük, “yabancı-peptit”lere yüksek afinite göstermesi, oluşturacağı yanıtın düzenlenmesinde anahtar görevi yapar. T hücrelerinin antijen sunumunda, aktive olmaları bu afinitenin derecesi ile doğrudan ilişkilidir [121].

HLA sınıf I; antijen sunum süreci iyi tanımlanmıştır. Hücre-içi patojenlerin tanınmasında, tolerans gelişiminde, otoimmünite ve nöronal fonksiyonlarda görev aldığı bilinmektedir. Neredeyse tüm çekirdekli hücrelerin membranlarında eksprese ettiği sınıf I molekülleri, sitotoksik T lenfositlerine spesifik olarak peptit sunumunda rol alır. Hem doğal hem de edinsel immünitedeki ortak görevleri; dokuya spesifik olarak tanımlanmalarında önem taşımaktadır [96]. Paratiroit dokusunun HLA sınıf I antijenleri açısından hem hücre yüzeyi, hem de hücre-içi ekspresyonlarının protein ve gen analizlerinin yapılması, paratiroit dokusuna ait immünojenik özelliklerin tanımlanmasına katkı sağlamaktadır.

Bugüne kadar paratiroid dokusunun HLA antijenleri açısından tarandığı çalışmalar; doku tipine göre farklılıklar belirtse de HLA-A, HLA-B ve HLA-C antijenlerinin ayrı ayrı ekspresyonları değerlendirilmemiştir. 1993'te Bjerneroth sınıf I moleküllerine ortak bir antikor kullanmıştır (aynı anda HLA-A, -B ve -C moleküllerine bağlanabilen poliklonal bir antikor). Doku tipine göre pozitifliğin değişebileceğini belirtmiştir. İmmünohistokimya ile yaptığı bu araştırmanın, dokuya yerleşik immün hücrelerin elimine edilmesiyle, sınıf I molekülleri açısından daha net değerlendirilebileceğini belirtmiştir [5]. 1999'da Tsuji ve arkadaşlarının, mekanik izolasyon ile kültüre ettiği paratiroid dokularını sınıf I molekülleri açısından akım sitometrisi ile kontrol etmiştir. Kültüre edildikçe az miktarda eksprese olan moleküllerin kültürün 5.gününde belirlenemediğini bildirmiştir [3]. 2001'de Timm, sıçanlarda gerçekleştirdiği paratiroid nakli; öncesi ve sonrasında (nakilden 8 hafta sonra çıkarılan dokularda) sınıf I molekülleri açısından histolojik değerlendirme yapmıştır. Tür-içi (*syngeneic*) nakillerde greft sürvisinin daha uzun olduğunu ve farklı türlerle yapılan nakillerde rejeksiyonun çok daha hızlı geliştiğini bildirmiştir. Sınıf I antijen ekspresyonlarının yoğun olduğu dokularda, sıçanlarda gerçekleşen rejeksiyonların sınıf I ile ilişkili olarak gerçekleştiğini iletmiştir [138]. 2007'de Nawrot ve arkadaşlarının, paratiroid dokusuna ait hücreleri nakil öncesinde 6 hafta kültüre etmiş ve kültüre edilen hücrelerin sınıf I moleküllerini (aynı anda HLA-A, -B ve -C moleküllerine bağlanabilen poliklonal bir antikor kullanmıştır) eksprese etmediğini belirtmiştir [1].

HLA sınıf I moleküllerinin, 43-45 kDa büyüklüğüne sahip olmaları sebebiyle ayrı ayrı değerlendirilmesi, paratiroid dokusunun sınıf I antijenlerinin daha ayırıcı şekilde belirlenmesini sağlamıştır. Çalışmada, sınıf I moleküllerinden HLA-A ve -B molekülleri, hem protein hem de gen seviyesinde paratiroid hiperplazi ve adenom dokulardan elde edilen hücrelerin kültüre edilmesi ile taranmıştır. Sağlıklı paratiroid, HLA-A ve -B açısından gen ekspresyonu seviyesi olarak karşılaştırılmıştır. HLA-C molekülü, protein seviyesinde paratiroid hiperplazi ve adenom dokulardan elde edilen hücrelerde taranmıştır.

Sağlıklı paratiroid dokularında HLA-A molekülünün, HLA-B molekülüne ve diğer iki doku tipine (hiperplazi-adenom dokuları) göre, gen seviyesindeki ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1). Sağlıklı dokunun, hiperplazi ve/veya adenomatöz gelişimi sürecinde HLA-A'nın gen ekspresyon

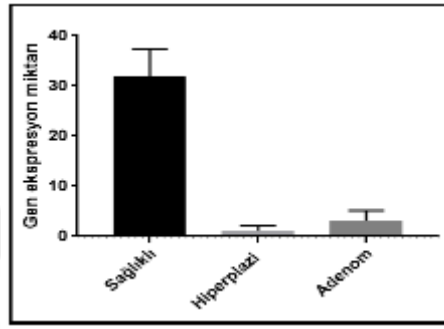
seviyesinin anlamlı farklılığı hastalık gelişiminde bir faktör olup olmadığı bilinmemektedir.

Sınıf I moleküllerinin, hiperplazi ve adenom dokularda günlere göre gen ekspresyonlarındaki azalma ve buna rağmen HLA-A için protein seviyesinin değişmemesi, transplantasyonda etkinlik gösterme eğilimine işaret etmektedir. Herhangi bir antijen sunulumu bulunmadığı durumlarda, sınıf I molekülleri boş kalan peptitleri hücre yüzeyine yalnızca fizyolojik sıcaklık değişimlerine bağlı olarak taşımaktadır [139]. 2013'de Cano ve arkadaşları, MEX-3C (mRNA stabilizasyonunda rol alan bir Ubikuitin E3 ligaz aktivitesine sahip protein) molekülünün, HLA-A yapısının stabilizasyonunda rol aldığını bildirmiştir [135]. 2014'de Vigneron ve arkadaşları, sınıf I moleküllerinin endoplazmik retikulumdan proteozomal yapı içerisinde ayrılıp hücre membranına yerleşmeden önce, peptit yüklenmesi sürecinin netleşemeyebileceğini bildirmiştir. Bu süreçte rol alan farklılıklar beraber düşünüldüğünde, her durum için ayrı bir mekanizmanın olabileceğine dikkat çekmiştir. Örneğin TAP-bağımlı sınıf I antijen sunulumunda, peptitidin yüklenmesinden sorumlu proteozomal kompleks golgi aygıtına ulaştığında kalite kontrolden geçecektir. Proteinin düzenlenmesinde C veya N terminal uçtan kırılmasının stabilizasyonlarını ve/veya etkinliklerini değiştireceğini belirtmiştir [140].

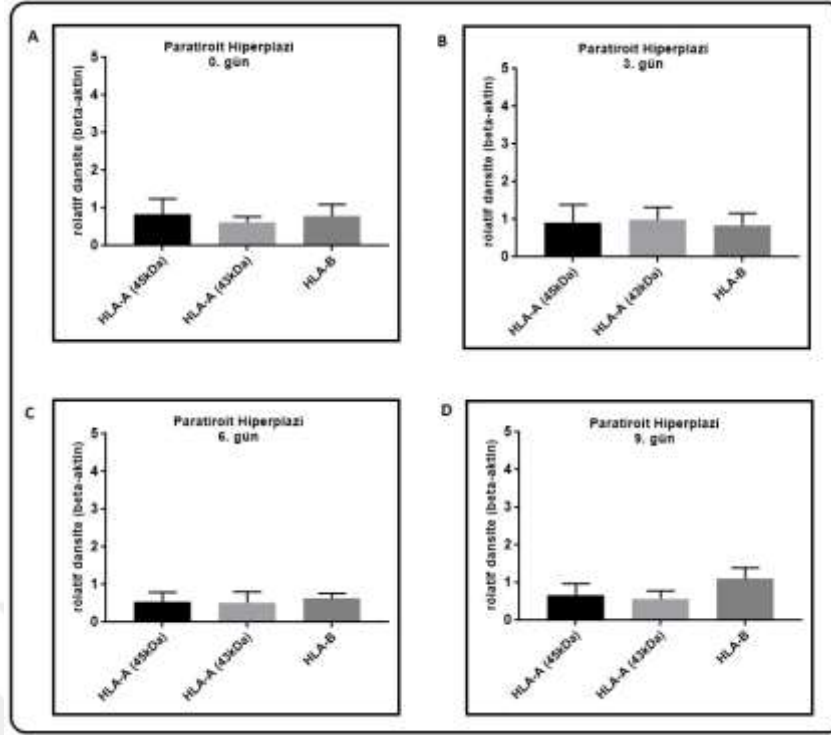
HLA sınıf I moleküllerinin peptit yüklenmesi tamamlanana kadar endoplazmik retikulum içerisinde stabilize halde kalmalarını sağlayan birçok molekül bulunmaktadır. Şaperonların, kırılğan sınıf I moleküllerinin bağlanma bölgesini saatler ve günlerce sabit tutarak, membrana yerleşmelerini desteklediği gösterilmiştir [141]. Bazı farklı proteinlerin ise sınıf I yapısına kovalent olarak bağlanan $\beta 2$ mikroglobülin ile zayıf etkileşimde kaldığı ve hücre membranında daha uzun süre stabil kalmalarını desteklediği bildirilmiştir [142].

Çalışma da paratiroid dokularında sınıf I moleküllerinin sırasıyla HLA-A, HLA-B ve -C'ye göre daha stabil olduğu, yapılan protein ekspresyon sonuçlarında gösterilmiştir. Gen ekspresyonlarında azalma görülse dahi; sınıf I moleküllerinin proteozomal/lizozomal yapıya yüklenmesi, TAP-bağımlı veya bağımsız sınıf I yapısı ile membrana taşınması süreçlerinin, farklı proteinlerle kontrolü bu yapıların gen ve protein düzeyinde farklı süreçlerle takip edildiğine işaret etmektedir. Hem hiperplazi hem de adenom dokularda HLA-A molekülünün kültüre edilen hücrelerde 9 güne

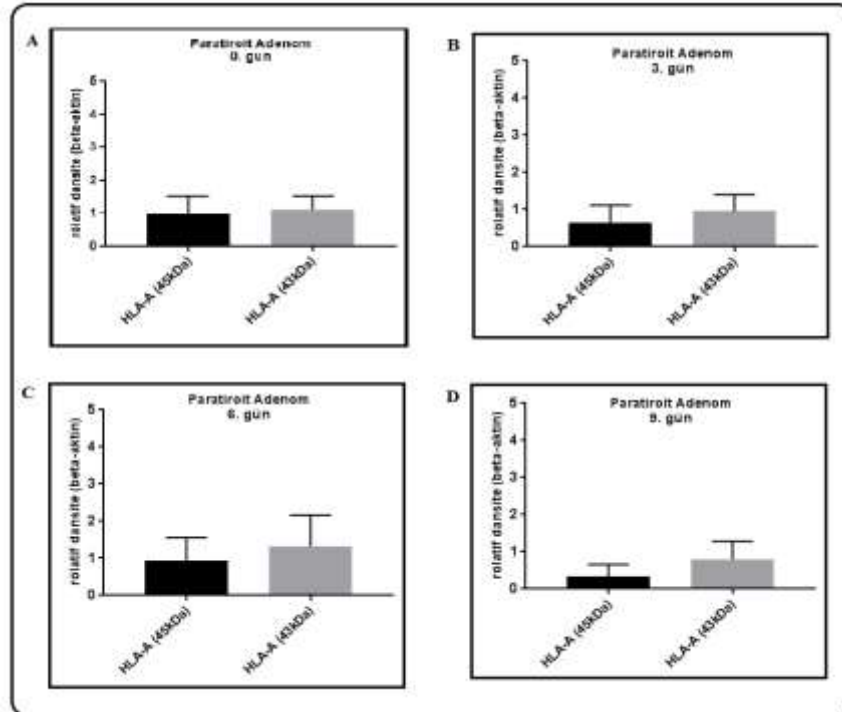
kadar 45 kDa, 43kDa'lık protein ürünlerinin her ikisinde değişmemesi stabilize edici moleküllerin varlığından kaynaklandığını düşündürmektedir. Burada bilinmeyen faktör sınıf I moleküllerinin hangi lizozomal/proteozomal işleme ile membrana taşındığı ve post-transkripsiyonel modifikasyonların farklılığıdır (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Protein analizleriyle, gen ekspresyonları değerleri arasındaki farklı sonuçlar, bu ve benzeri çalışmalarda “sadece gen” ya da “sadece protein” analizinin hatalı sonuçlara neden olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızın en önemli bulgularından biri gen ekspresyonları verisi ile protein düzeyi verilerinin birlikte değerlendirilebilmesidir.



Şekil 4.1: Sağlıklı, hiperplazik, adenomatöz paratiroid dokularının HLA-A antijeni gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması ($p < 0,0001$).



Şekil 4.2: Paratiroid hiperplazi dokusundaki günlere göre HLA-sınıf I moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim. **A-**0.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa ve HLA-B protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,5706$). **B-**3.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa ve HLA-B protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,6888$). **C-**6.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa ve HLA-B protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,5506$). **D-**9.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa ve HLA-B protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,002$).



Şekil 4.3: Paratiroid adenom dokusundaki günlere göre HLA-sınıf I moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim. **A-**0.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,4330$). **B-**3.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,8855$). **C-**6.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,425$). **D-**9.gündeki HLA-A 45kDa, 43kDa protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,0531$).

HLA sınıf II molekülleri birçok immün yanıtın oluşmasında kritik öneme sahiptir. Sınıf II moleküllerindeki varyasyonlar, immün yanıtın keskinliğini tanımlamaktadır. Endozomal proteolitik süreçler, sınıf II moleküllerinin sunacağı peptidin bağlanma bölgesinin spesifitesini belirler. Bu spesifik moleküllerin bağlayacakları ve sunacakları peptit yapısının oluşturacağı net yanıt, immün sistemin yönünü belirler.

Sınıf II molekülleri protein komplekslerinden, endozomal veya lizozomal kompartmanlarda hidrolize edilirler. Sınıf II molekülleri endoplazmik retikulum içerisinde α ve β zincirleri bağlanarak dimer yapılarını oluştursa da, sınıf I moleküllerinin aksine yabancı peptitlerle ancak endositik yolağa geçtikten sonra bağlanabilirler [143, 144]. Yabancı antijenlerin HLA sınıf II moleküllerine bağlanmadan önce, klatriin-bağımlı reseptörlerle düzenlenen endositoz veya klatriin-bağımsız macropinositoz ile hücre içine alınması gerekmektedir. Hücre içine alınan yabancı antijenler; proteozomal/lizozomal kompleks içerisinde pH seviyesi düşürülerek, kademeli olarak birçok degrade edici proteazlar sayesinde parçalanırlar [144-146].

HLA sınıf II molekülleri şaperon proteinlerin kontrolünde ve invariant zincir'in (li yani CD74) yapıya bağlanması ile endoplazmik retikulumda katlanma ve golgi aygıtına taşınma sürecine girerler. Sınıf II-CD74 kompleksi endozomal yapı içerisinde; multiveziküler yapı/fagozom/sınıf II benzeri şaperon proteinler olarak da bilinen HLA-DM ve -DO varlığında peptit yüklenmesine hazır hale getirilirler. CD74'ün bağlanması ile sınıf II molekülleri stabil hale gelir. CLIP yapısı ise, yabancı peptit molekülü bağlanana kadar sınıf II moleküllerine bağlı kalır. HLA-DM antijenik peptidin vezikül içerisine dahil olması ile CLIP yapısının ayrılmasını indükler. CLIP yapısının peptit-bağlanma bölgesindeki kısmı, yabancı peptit ile bağlanma bölgesi için yarışmalıdır [116-118, 144]. Herhangi bir tehlike sinyalinin olmadığı durumlarda, yani "self-peptit" ile bağlı olan sınıf II moleküllerinin genellikle hücre membranında lizozomal kompartmanda hızla yıkıldığı bildirilmiştir [110].

Sınıf II moleküllerinin stabilizasyonunda rol alan birçok faktör tanımlanmıştır. Endoplazmik retikulum içerisinde her iki zincirin bir araya gelmesinde görev alan hidrojen bağları, şaperon proteinler, CD74 ve aynı zamanda α ve β zinciri arasındaki belirli a.a. pozisyonlarının degrade edici enzimlere karşı, yapının stabilizasyonuna destek olduğu bildirilmiştir [139].

Paratiroid dokusunun HLA sınıf II antijenleri açısından hem hücre yüzeyi hem de hücre içi ekspresyonlarının, protein ve gen analizlerinin yapılması, paratiroid dokusuna ait immünojenik özelliklerin tanımlanmasına katkı sağlamaktadır. Bugüne kadar paratiroid dokusunun HLA antijenleri açısından tarandığı çalışmalarda doku tipine göre farklılıklar belirtilse de HLA-DR, HLA-DP ve HLA-DQ α 1, HLA-DQ α 2 antijenlerinin ayrı ayrı ekspresyonları hem gen hem protein seviyesinde değerlendirilmemiştir.

1993'te Bjerneroth ve arkadaşları, sınıf II moleküllerinden HLA-DR ekspresyonunu farklı paratiroid dokularından izole ettiği hücreleri, IFN varlığında/yokluğunda kültüre ederek değerlendirmiştir. Doku tipine göre pozitifliğin değişebileceğini ve immünohistokimya ile yaptığı bu çalışmada sağlıklı dokuların zayıf ekspresyona sahip olduğunu belirtmiştir [5]. 1998'de Bjerneroth ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında, HLA-DR, -DQ, -DP ekspresyonlarını 27 adenom ve 11 hiperplazi dokusunda immünohistokimya ile göstermiştir. Bu dokularda HLA sınıf II moleküllerinin ekspresyonlarının, en fazla olandan en az olana doğru sırasıyla HLA-DR, -DQ ve -DP olduğunu bildirmiştir. Bu sınıf II moleküllerinin sağlıklı dokudan farklı oluşunu, viral enfeksiyonlar veya onkogenik aktivasyonların patolojik değişikliklere neden olabileceğine dikkat çekmiştir [4]. 2007'de Nawrot ve arkadaşları, paratiroid dokusuna ait hücrelerin nakil öncesinde 6 hafta kültüre edildiğinde sınıf II ekspresyonlarının azaldığını bildirmiştir [1].

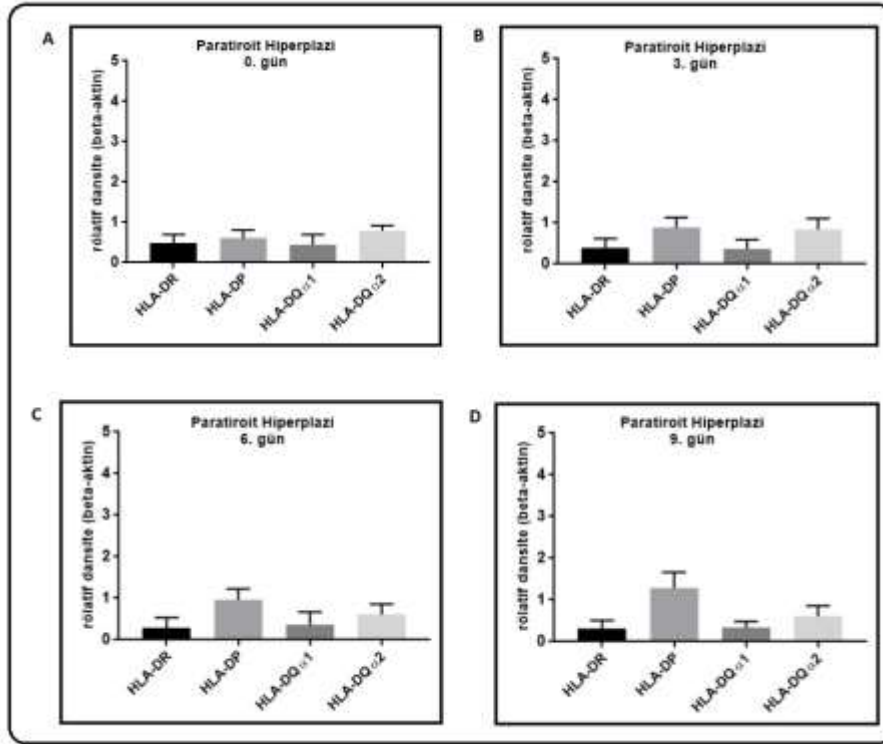
Böbrek nakillerinde; sınıf II moleküllerinde HLA-DR için alıcı-verici arasında en az bir alel uyumu şartı bulunmaktadır. Son yıllarda nakil sonrası gelişebilen donör spesifik antikor oluşumunda HLA-DQ'nun etkinliği bildirilmiştir. HLA-DQ uyumsuz yapılmış 55 böbrek naklinde, donöre spesifik antikor oluşma oranı diğer HLA-uyumsuz nakillere göre 3 kat fazla olduğu gösterilmiş ve DQ zincirinin özellikle alfa zincirini kodlayan genlere ait alel farkının önemi belirtilmiştir [147, 148]. Kemik iliği nakillerinde ise alıcı-verici arasındaki HLA-A, -B, -C ve -DRB1 için uyum şartı bulunmaktadır. Bu tip nakil genellikle alel uyumu taşıyan kardeşler arasında yapılır. HLA-DP ise son yıllarda bu nakil tipinde önem kazanmaktadır.

Çalışmada sınıf II moleküllerinden HLA-DR, -DP ve -DQ α 1, -DQ α 2 molekülleri hem protein, hem de gen seviyesinde paratiroid sağlıklı, hiperplazik ve adenomatöz dokulardan elde edilen hücrelerde tanımlanmıştır.

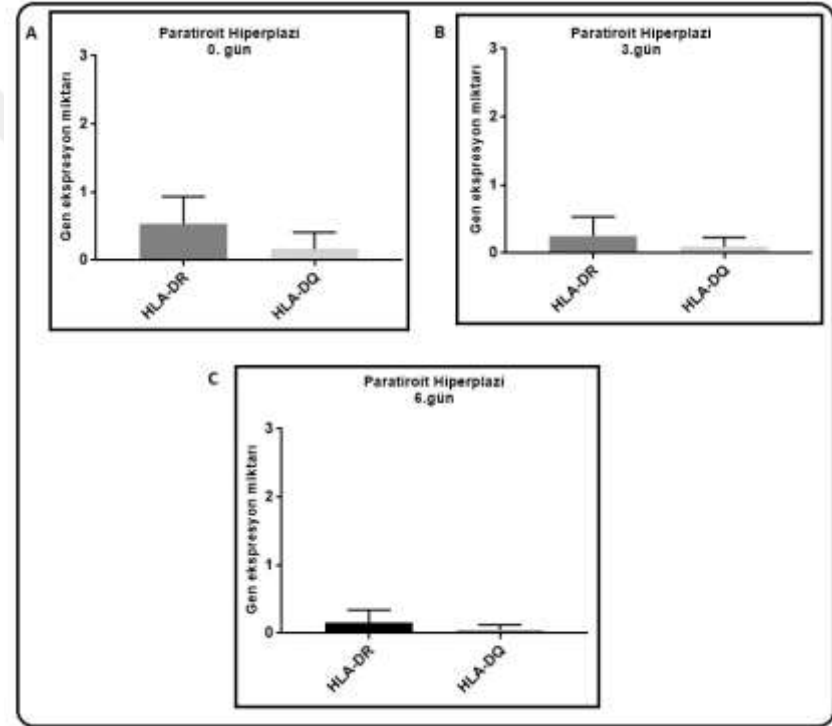
Hiperplazik paratiroid dokularında sınıf II moleküllerinin protein ekspresyon seviyeleri kültürün 0., 3., 6., 9. günleri için ayrı ayrı değerlendirildiğinde; HLA-DP ve HLA-DQ α 2 ekspresyonlarının HLA-DR ve HLA-DQ α 1 moleküllerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4). Gen ekspresyonları açısından ise kültürün yalnızca 0. gününde HLA-DR, HLA-DQ'ya göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek seviyede ekspresyona olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5).

Adenomatöz paratiroid dokularında sınıf II moleküllerinin protein ekspresyon seviyeleri kültürün 0., 3., 6., 9. günleri için ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 3. ve 6. günlerde HLA- DQ α 1 ve HLA-DQ α 2 protein ekspresyonlarının HLA-DR ve HLA-DP'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6). Kültürün 0. gününde HLA-sınıf II moleküllerinin protein ekspresyonlarında anlamlı düzeyleri arasında bir artış görülüyor olsa da bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilememiştir ($p=0,0582$) (Şekil 4.6-A).

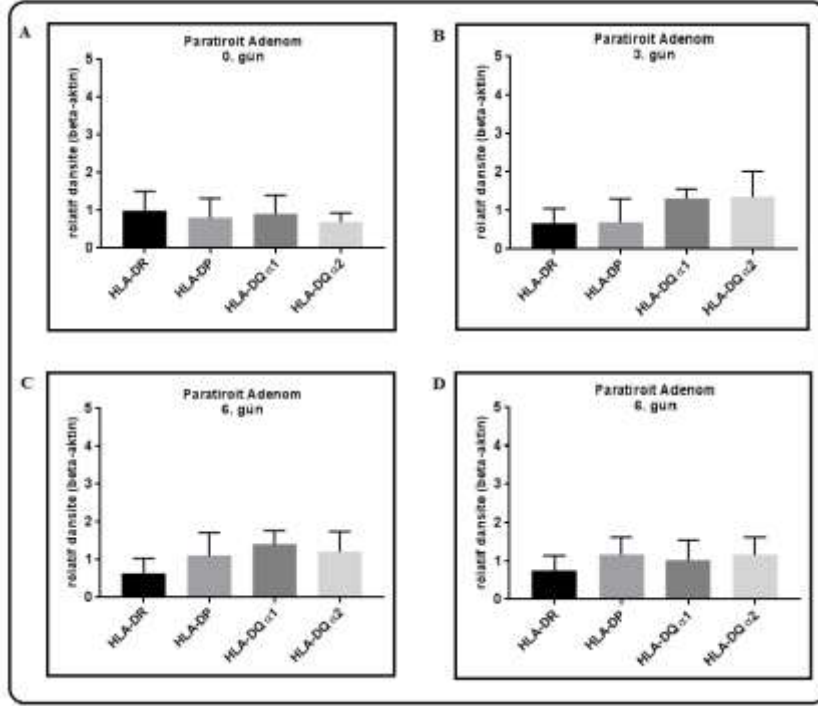
Sağlıklı paratiroid dokularının HLA-DR açısından, diğer iki doku tipine (hiperplazi-adenom dokuları) göre, gen seviyesinde ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde az olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.7). Sağlıklı dokunun, hiperplazi ve/veya adenomatöz gelişimi sürecinde HLA-DR'nin gen ekspresyonu seviyesinin anlamlı farklılığı, hastalık gelişimine bir etken olup olmadığı bilinmemektedir.



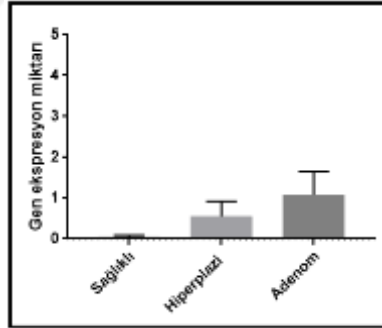
Şekil 4.4: Paratiroid hiperplazi dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim. **A**-0.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri ($p=0,011$). **B**-3.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri ($p<0,0001$). **C**-6.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri ($p<0,0001$). **D**-9.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri ($p<0,0001$).



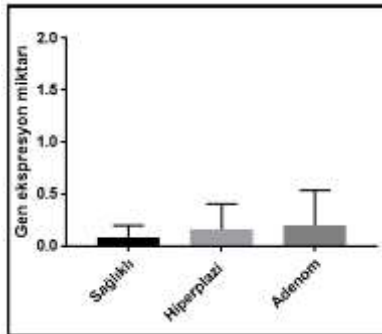
Şekil 4.5: Paratiroid hiperplazi dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin gen ekspresyonlarındaki değişim. **A**-0.gündeki HLA-DR ve HLA-DQα gen ekspresyon seviyeleri ($p=0,0309$). **B**-3.gündeki HLA-DR ve HLA-DQα gen ekspresyon seviyeleri ($p=0,2267$). **C**-6.gündeki HLA-DR ve HLA-DQα gen ekspresyon seviyeleri ($p=0,203$).



Şekil 4.6: Paratiroid adenom dokusundaki günlere göre HLA-sınıf II moleküllerinin protein ekspresyonlarındaki değişim. **A-**0.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri (p=0,0582). **B-**3.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri (p=0,0037). **C-**6.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri (p=0,0203). **D-**9.gündeki HLA-DR, -DP ve HLA-DQα1, -DQα2 protein ekspresyon seviyeleri (p=0,1563).



Şekil 4.7: Sağlıklı, hiperplazik, adenomatöz paratiroid dokularının HLA-DR antijeni gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması (p=0,0214).



Şekil 4.8: Sağlıklı, hiperplazik, adenomatöz paratiroid dokularının HLA-DQ antijeni gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması (p=0,8077).

MiHa antijenleri bazı bireylerde eksprese edilen, alıcı ve verici arasında spesifik antijenik farklılığı tanımlayan proteinlerdir. MiHa antijenlerinin dokulardaki varlığı, dağılımı, HLA sınıf I ve II moleküllerine özgü oluşu ve cinsiyet/otozomal geçiş göstermesi immün rejeksiyonun transplantasyon sonrası yanıtını tanımlamaktadır [125]. Alıcı-verici arasındaki herhangi bir proteinde bulunan olası polimorfizm T hücrelerinin HLA-bağımlı aktivasyonunda görev alabilmektedir. İlk keşfedildikleri dönemde, MiHa'lar sınıf I ve II moleküllerinin her ikisiyle de sunulabilen ve hem CD4 hem de CD8 T lenfositlerini aktive edebilen peptitler oldukları düşünülmektedir. Fakat kornea, kemik iliği ve solid organ nakillerinde gerçekleşen immün reddin araştırılması ile CD4 veya CD8 T lenfositler için ayrı sunum etkinlikleri gösterdikleri belirlenmiştir. Bazı iyi tanımlanmış MiHa peptitleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir [149, 150]. T hücrelerinin tek bir a.a. değişikliğindeki farklılığı tanıyabilme yetenekleri kemik iliği nakillerinde etkindir. Bugüne kadar 100'den fazla MiHa tanımlanmıştır. Bu antijenlerin transplantasyon etkinliklerine ait veriler çok daha azdır [149, 151].

2010-2017 yılları arasında, MiHa tanımlanma süreci için farklı bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem; tüm genom sekanslama ile alıcı-verici arasındaki SNP uyumunun taranmasıdır [126, 152, 153]. Fakat polimorfik MiHa antijenleri kadar, polimorfik olmayan MiHa'ların da bulunması bu yöntemi yetersiz kılmaktadır [154]. Transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel modifikasyonlar HLA molekülüne ile sunulacak peptitidin yapısında birçok değişikliğe sebep olmaktadır [155]. Bu sebeple MiHa antijenlerinin taranması ve yapısının belirlenmesi için kütle spektroskopisi ve proteomik analizlerin yapılmasının daha net bir tarama sağlayacağı düşünülmektedir [151].

Paratiroid dokusunun MiHa peptitlerince varlığının araştırılması, HLA uygunluğu olan nakillerde, nakil-reddi durumuna açıklık getirmesi umulmaktadır. SP110 peptidi HLA-A aleli taşıyan bireylerin dokularında eksprese edildiği bildirilmiş olup, 2017'de yapılan bir çalışmada; at (*Equus caballus*) lökositlerindeki SP110 peptidinin 4 izoformu elde edilerek, makrofaj aktivasyonundaki rolleri belirlenmiştir [8]. İnsanlarda SP110 peptidi 689a.a.'lık bir molekülden post-transkripsiyonel düzenlenme sonrasında 7 farklı izoformu olduğu bildirilmiştir. Bu 7 farklı izoformun insanlarda hangisinin aktif rol oynadığı henüz bilinmemektedir. Yedi

izoformun alternatif kırılma ve “reverse order” sentezinin gerçekleştiği 2016 yılında belirlenmiştir [134].

Paratiroid dokularındaki SP110 peptidinin varlığının araştırılması; ilk olarak paratiroid dokusunun embriyolojisinden seçilmiştir. Üst paratiroid bezleri embriyolojik hayatta 4. brankiyal keseden, lateral tiroid ile beraber gelişir. Alt paratiroid bezleri ise timus ile beraber 3. brankiyal keseden kökenini alır. Göç sırasında timus ile beraber aşağı doğru inerken boyun alt kısımlarında timustan ayrılır ve tiroid alt kutbunun yakınında yer alırlar [156, 157]. SP110 peptidinin lenfoid orijinli oluşu [158] ve alt paratiroid bezlerinin timustan farklılaşması paratiroid dokusundaki SP110 varlığının araştırılmasında önem kazanmıştır. İlerleyen çalışmalarda SP110 peptidinin paratiroid transplantasyonundaki etkinliğinin detaylı araştırmalarla belirlenmesi hedeflenmektedir.

Tablo 4.1: İyi tanımlanmış MiHa peptitleri.

MiHa	Species	Chromosome	Gene	MHC restriction	Tissue specificity	dbSNP Reference ID
HA-1	Human	19p13.3	HMHA1	HLA-A2/B60	Hematopoietic	rs1801284
HA-2	Human	7p13-p11.2	MYO1G	HLA-A2	Hematopoietic	-
HA-3	Human	15q24-q25	AKAP13	HLA-A1	Ubiquitous	rs7162168
HA-8	Human	9p24.2	KIAA0020	HLA-A2	Ubiquitous	rs2173904
HB-1	Human	5q32	HMHB1	HLA-B44	B-cell	rs161557
ACC-1	Human	15q24.3	BCL2A1	HLA-A24	Hematopoietic	rs1138357
ACC-2	Human	15q24.3	BCL2A1	HLA-B44	Hematopoietic	rs3826007
SP110	Human	2q37.1	SP110	HLA-A03	Hematopoietic	rs1365776
PANE1	Human	22q13.2	CENPM	HLA-A03	Hematopoietic	-
UGT2B17	Human	4q13	UGT2B17	HLA-A29	Ubiquitous	-

Literatürde nakil protokollerinde özellikle HLA-A, -B, -DR ve -DQ antijenleri alıcı-verici arasındaki uyum açısından önemli olması, bu çalışmada değerlendirilen HLA moleküllerinin protein düzeyleri ile birlikte eş zamanlı olarak gen ekspresyon değerleri de incelenmiştir.

Paratiroid nakilleri için literatürde henüz HLA sınıf I-II veya MiHa moleküllerinin etkinliği bilinmemektedir. Böbrek, kemik iliği gibi nakil tiplerinde rutin olarak test edilen immünolojik tarama testleri (*cross match* testleri, HLA tipleme, mikrolenfositotoksitesite, panel reaktif antikor gibi) için kriterler belirlenmemiştir. Paratiroid nakillerinin bu anlamda değerlendirilmesi; dokunun immünojenik

özelliklerinin detaylı olarak bilinmesi ve MiHa peptit dizilerinin nakil başarısı/başarısızlığı gibi durumlarda etkinliklerinin takip edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın gelecekte yapılacak nakil başarısının artırılmasına, nakledilecek doku seçiminde belirli kriterlerin oluşmasına destek olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. **Nawrot, I., B. Wozniewicz, T. Tolloczko, et al.,** *Allotransplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results.* Transplantation, 2007. 83(6): p. 734-40.
2. **Barczynski, M., F. Golkowski, and I. Nawrot,** *Parathyroid transplantation in thyroid surgery.* Gland Surg, 2017. 6(5): p. 530-536.
3. **Tsuji, K., S. Fuchinoue, K. Kai, et al.,** *Culture of human parathyroid cells for transplantation.* Transplant Proc, 1999. 31(7): p. 2697.
4. **Bjerneroth, G., C. Juhlin, S. Gudmundsson, et al.,** *Major histocompatibility complex class II expression and parathyroid autoantibodies in primary hyperparathyroidism.* Surgery, 1998. 124(3): p. 503-9.
5. **Bjerneroth, G., C. Juhlin, J. Rastad, et al.,** *MHC class I and II antigen expression on parathyroid cells and prospects for their allogenic transplantation.* Transplantation, 1993. 56(3): p. 717-21.
6. **Aysan, E., B. Altug, C. Ercan, et al.,** *Parathyroid Allotransplant With a New Technique: A Prospective Clinical Trial.* Exp Clin Transplant, 2016. 14(4): p.431-5.
7. **Mehta, S., D.A. Cronkite, M. Basavappa, et al.,** *Maintenance of macrophage transcriptional programs and intestinal homeostasis by epigenetic reader SP140.* Sci Immunol, 2017. 2(9).
8. **Chen, Q., Q. Tong, H. Ge, et al.,** *Identification of SP110 in horse (Equus caballus): Isolation of novel splice variants and evidence of activation effects on macrophages.* Tuberculosis (Edinb), 2016. 101: p. 85-94.
9. **Cave, A.J.E.,** *Richard Owen and the discovery of the parathyroid glands* Oxford University Press, 1953. 2: p. 217-222.
10. **V. C. Medvei CBE, M., FRCP,** *A History of Endocrinology.* 1 ed. 1982, England: Springer.
11. **Halsted WS, E.H.,** *The parathyroid glandules. Their blood supply, and their preservation in operation upon the thyroid gland.* Annals of Surgery, 1907.
12. **Delattre, J.F., J.B. Flament, J.P. Palot, et al.,** *[Variations in the parathyroid glands. Number, situation and arterial vascularization. Anatomical study and surgical application].* J Chir (Paris), 1982. 119(11): p. 633-41.
13. **Akerstrom, G., C. Rudberg, L. Grimelius, et al.,** *Histologic parathyroid abnormalities in an autopsy series.* Hum Pathol, 1986. 17(5): p. 520-7.
14. **Wang, C.,** *The anatomic basis of parathyroid surgery.* Ann Surg, 1976. 183(3): p.271-5.
15. **Akerstrom, G., J. Malmaeus, and R. Bergstrom,** *Surgical anatomy of human parathyroid glands.* Surgery, 1984. 95(1): p. 14-21.
16. **Trier, J.S.,** *The fine structure of the parathyroid gland.* J Biophys Biochem Cytol, 1958. 4(1): p. 13-22.

17. **Baloch, Z.W. and V.A. LiVolsi**, *Parathyroid Glands, Pathology*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier. p. 474.
18. *Normal Blood Calcium Levels Decrease as We Get Older*. Retrieved September 2016, from <http://www.parathyroid.com/Normal-Blood-Calcium-Levels.htm>.
19. **Blaine, J., M. Chonchol, and M. Levi**, *Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015. 10(7): p. 1257-72.
20. **Tanaka, Y., S. Nakayamada, and Y. Okada**, *Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. 4(3): p. 325-8.
21. **Naveh-Many, T.**, *Minireview: the play of proteins on the parathyroid hormone messenger ribonucleic Acid regulates its expression*. *Endocrinology*, 2010.151(4): p. 1398-402.
22. **Bell, O., J. Silver, and T. Naveh-Many**, *Identification and characterization of cis acting elements in the human and bovine PTH mRNA 3'-untranslated region*. *J Bone Miner Res*, 2005. 20(5): p. 858-66.
23. **Kilav, R., J. Silver, and T. Naveh-Many**, *A conserved cis-acting element in the parathyroid hormone 3'-untranslated region is sufficient for regulation of RNA stability by calcium and phosphate*. *J Biol Chem*, 2001. 276(12): p. 8727-33.
24. **Maier, G.W., M.E. Kreis, W. Renn, et al.**, *Parathyroid hormone after adenectomy for primary hyperparathyroidism. A study of peptide hormone elimination kinetics in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(11): p. 3852-6.
25. **Libutti, S.K., H.R. Alexander, D.L. Bartlett, et al.**, *Kinetic analysis of the rapid intraoperative parathyroid hormone assay in patients during operation for hyperparathyroidism*. *Surgery*, 1999. 126(6): p. 1145-50; discussion 1150-1.
26. **ALGLIB**, 1999.
27. **Bieglmayer, C., G. Prager, and B. Niederle**, *Kinetic analyses of parathyroid hormone clearance as measured by three rapid immunoassays during parathyroidectomy*. *Clin Chem*, 2002. 48(10): p. 1731-8.
28. **Bieglmayer, C., K. Kaczirek, G. Prager, et al.**, *Parathyroid hormone monitoring during total parathyroidectomy for renal hyperparathyroidism: pilot study of the impact of renal function and assay specificity*. *Clin Chem*, 2006. 52(6): p.1112-9.
29. **Duquenne, M., G. Weryha, P. Kaminsky, et al.**, *Serum parathormone profile during surgical treatment of hyperfunctioning parathyroid adenoma: a multicompartmental model*. *J Bone Miner Res*, 1994. 9(9): p. 1371-5.
30. **Leiker, A.J., T.W. Yen, D.C. Eastwood, et al.**, *Factors that influence parathyroid hormone half-life: determining if new intraoperative criteria are needed* *JAMA Surg*, 2013. 148(7): p. 602-6.
31. **Ritter, C.S., B.H. Haughey, B. Miller, et al.**, *Differential gene expression by oxyphil and chief cells of human parathyroid glands*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012.97(8): p. E1499-505.

32. **Rives, J.D. and D.D. Baker**, *Anatomy of the Attachments of the Diaphragm: Their Relation to the Problems of the Surgery of Diaphragmatic Hernia*. Ann Surg, 1942. 115(5): p. 745-55.
33. **Ovalle, W.K., P.C. Nahirney, and F.H. Netter**, *Netter's essential histology*. 2nd ed. 2013, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. xv, 517 pages.
34. **Christie, A.C.**, *A histochemical property of the oxyphil cells of the human parathyroid glands*. J Clin Pathol, 1955. 8(4): p. 302-9.
35. **Palade, G.E.**, *An electron microscope study of the mitochondrial structure*. J Histochem Cytochem, 1953. 1(4): p. 188-211.
36. **Palade, G.E.**, *The fine structure of mitochondria*. Anat Rec, 1952. 114(3): p. 427-51.
37. **Lever, J.D.**, *Fine structural appearances in the rat parathyroid*. J Anat, 1957. 91(1): p. 73-81.
38. **Eroschenko, V.P. and M.S.H.d. Fiore**, *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. 11th ed. 2008, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xvii, 532 p.
39. **Allen, T.B. and K.M. Thorburn**, *The oxyphil cell in abnormal parathyroid glands. A study of 114 cases*. Arch Pathol Lab Med, 1981. 105(8): p. 421-7.
40. **Suzuki, Y., M. Suzuki, Y. Hirasawa, et al.**, *Oxyphil cells of parathyroid glands in chronic renal failure may not secrete parathyroid hormone*. Nephron, 1990. 56(1): p. 62-5.
41. **Tanaka, Y., H. Funahashi, T. Imai, et al.**, *Oxyphil cell function in secondary parathyroid hyperplasia*. Nephron, 1996. 73(4): p. 580-6.
42. **Mizobuchi, M., C.S. Ritter, I. Krits, et al.**, *Calcium-sensing receptor expression is regulated by glial cells missing-2 in human parathyroid cells*. J Bone Miner Res, 2009. 24(7): p. 1173-9.
43. **Ritter, C.S., B.H. Haughey, H.J. Ambrecht, et al.**, *Distribution and regulation of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase in human parathyroid glands*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. 130(1-2): p. 73-80.
44. **Brown, A.J., C.S. Ritter, A.S. Weiskopf, et al.**, *Isolation and identification of 1alpha-hydroxy-3-epi-vitamin D3, a potent suppressor of parathyroid hormone secretion*. J Cell Biochem, 2005. 96(3): p. 569-78.
45. **Nonaka, D.**, *Study of parathyroid transcription factor Gcm2 expression in parathyroid lesions*. Am J Surg Pathol, 2011. 35(1): p. 145-51.
46. **Lomonte, C., R. Martino, M. Selvaggiolo, et al.**, *Calcitriol pulse therapy and histology of parathyroid glands in hemodialysis patients*. J Nephrol, 2003. 16(5): p. 716-20.
47. **Sumida, K., M. Nakamura, Y. Ubara, et al.**, *Histopathological alterations of the parathyroid glands in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism refractory to cinacalcet hydrochloride*. J Clin Pathol, 2011. 64(9): p. 756-60.
48. **Kitazawa, R., S. Kitazawa, M. Fukase, et al.**, *The expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in normal parathyroid: histochemistry and in situ hybridization*. Histochemistry, 1992. 98(4): p. 211-5.

49. **Kitazawa, R., S. Kitazawa, S. Maeda, et al.**, *Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in parathyroid tissue under normal and pathological conditions*. *Histol Histopathol*, 2002. 17(1): p. 179-84.
50. **Chen, H., S. Emura, and S. Shoumura**, *Ultrastructure of the water-clear cell in the parathyroid gland of SAMP6 mice*. *Tissue Cell*, 2006. 38(3): p. 187-92.
51. **Emura, S., S. Shoumura, and H. Isono**, *Ultrastructure of the water-clear cell in the rabbit parathyroid gland*. *Arch Histol Cytol*, 1992. 55(2): p. 159-66.
52. **Ezzat, T., G.M. Maclean, R. Parameswaran, et al.**, *Primary hyperparathyroidism with water clear cell content: the impact of histological diagnosis on clinical management and outcome*. *Ann R Coll Surg Engl*, 2013. 95(3): p. e60-2.
53. **Küçükkaya B., A.L.**, *Mitojenle etkinleşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2012. 37(2):p. 218-228.
54. **Albright, F. and R. Ellsworth**, *STUDIES ON THE PHYSIOLOGY OF THE PARATHYROID GLANDS: I. Calcium and Phosphorus Studies on a Case of Idiopathic Hypoparathyroidism*. *J Clin Invest*, 1929. 7(2): p. 183-201.
55. **Conigrave, A.D., S.J. Quinn, and E.M. Brown**, *Cooperative multi-modal sensing and therapeutic implications of the extracellular Ca(2+) sensing receptor*. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. 21(10): p. 401-7.
56. **Conigrave, A.D.**, *The Calcium-Sensing Receptor and the Parathyroid: Past, Present, Future*. *Front Physiol*, 2016. 7: p. 563.
57. **Fitzpatrick, L.A., M.L. Brandi, and G.D. Aurbach**, *Calcium-controlled secretion is effected through a guanine nucleotide regulatory protein in parathyroid cells*. *Endocrinology*, 1986. 119(6): p. 2700-3.
58. **Fitzpatrick, L.A., M.L. Brandi, and G.D. Aurbach**, *Control of PTH secretion is mediated through calcium channels and is blocked by pertussis toxin treatment of parathyroid cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. 138(2): p. 960-5.
59. **Chen, C.J., J.V. Barnett, D.A. Congo, et al.**, *Divalent cations suppress 3',5'-adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells*. *Endocrinology*, 1989. 124(1): p. 233-9.
60. **Brown, E.M., G.e.-H. Fuleihan, C.J. Chen, et al.**, *A comparison of the effects of divalent and trivalent cations on parathyroid hormone release, 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate accumulation, and the levels of inositol phosphates in bovine parathyroid cells*. *Endocrinology*, 1990. 127(3): p. 1064-71.
61. **Malasics, A., D. Boda, M. Valisko, et al.**, *Simulations of calcium channel block by trivalent cations: Gd(3+) competes with permeant ions for the selectivity filter*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1798(11): p. 2013-21.

62. **Colella, M., A. Gerbino, A.M. Hofer, et al.**, *Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor*. F1000Res, 2016. 5.
63. **Johnson, J.A. and R. Kumar**, *Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins*. Semin Nephrol, 1994. 14(2): p. 119-28.
64. **Kumar, R.**, *Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney*. J Cell Biochem, 1995. 57(3): p. 392-8.
65. **Felsenfeld, A., M. Rodriguez, and B. Levine**, *New insights in regulation of calcium homeostasis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013. 22(4): p. 371-6.
66. **Holick, M.F.**, *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2004. 80(6 Suppl): p. 1678S-88S.
67. **Heaney, R.P., R.R. Recker, J. Grote, et al.**, *Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(3): p. E447-52.
68. **Friedl, C. and E. Zitt**, *Vitamin D prohormone in the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2017. 10: p. 109-122.
69. **Henry, H.L.**, *Regulation of vitamin D metabolism*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. 25(4): p. 531-41.
70. **Marks, J., E.S. Debnam, and R.J. Unwin**, *Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. 299(2): p. F285-96.
71. **Biber, J., N. Hernando, and I. Forster**, *Phosphate transporters and their function*. Annu Rev Physiol, 2013. 75: p. 535-50.
72. **Segawa, H., I. Kaneko, A. Takahashi, et al.**, *Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter*. J Biol Chem, 2002. 277(22): p. 19665-72.
73. **Deliot, N., N. Hernando, Z. Horst-Liu, et al.**, *Parathyroid hormone treatment induces dissociation of type IIa Na⁺-P(i) cotransporter-Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 complexes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005.289(1):p.C159-67.
74. **Clarke, B.L., T.J. Vokes, J.P. Bilezikian, et al.**, *Effects of parathyroid hormone rhPTH(1-84) on phosphate homeostasis and vitamin D metabolism in hypoparathyroidism: REPLACE phase 3 study*. Endocrine, 2017. 55(1): p.273-282.
75. **Burris, D., R. Webster, S. Sheriff, et al.**, *Estrogen directly and specifically downregulates NaPi-IIa through the activation of both estrogen receptor isoforms (ERalpha and ERbeta) in rat kidney proximal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. 308(6): p. F522-34.
76. **Faroqui, S., M. Levi, M. Soleimani, et al.**, *Estrogen downregulates the proximal tubule type IIa sodium phosphate cotransporter causing phosphate wasting and hypophosphatemia*. Kidney Int, 2008. 73(10): p. 1141-50.
77. **Ishiguro, M., H. Yamamoto, M. Masuda, et al.**, *Thyroid hormones regulate phosphate homeostasis through transcriptional control of the renal*

- type IIa sodium-dependent phosphate co-transporter (Npt2a) gene.* Biochem J, 2010. 427(1): p. 161-9.
78. **Whang, R., E.M. Hampton, and D.D. Whang,** *Magnesium homeostasis and clinical disorders of magnesium deficiency.* Ann Pharmacother, 1994. 28(2): p. 220-6.
 79. **Quamme, G.A.,** *Recent developments in intestinal magnesium absorption.* Curr Opin Gastroenterol, 2008. 24(2): p. 230-5.
 80. **Schlingmann, K.P., M.C. Sassen, S. Weber, et al.,** *Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia.* J Am Soc Nephrol, 2005. 16(10): p. 3061-9.
 81. **Ferre, S., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels,** *Sensing mechanisms involved in Ca²⁺ and Mg²⁺ homeostasis.* Kidney Int, 2012. 82(11): p. 1157-66.
 82. **Paunier, L.,** *Effect of magnesium on phosphorus and calcium metabolism.* Monatsschr Kinderheilkd, 1992. 140(9 Suppl 1): p. S17-20.
 83. **Fang, L., B. Tang, D. Hou, et al.,** *Effect of parathyroid hormone on serum magnesium levels: the neglected relationship in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism.* Ren Fail, 2016. 38(1): p. 50-6.
 84. **Mantovani, G., F.M. Elli, and S. Corbetta,** *Hypothyroidism associated with parathyroid disorders.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. 31(2): p. 161-173.
 85. **Mosekilde, L. and M.S. Christensen,** *Decreased parathyroid function in hyperthyroidism: interrelationships between serum parathyroid hormone, calcium-phosphorus metabolism and thyroid function.* Acta Endocrinol (Copenh), 1977. 84(3): p. 566-75.
 86. **Cocchiara, G., M. Cajazzo, S. Fazzotta, et al.,** *[Risk factors' analysis of transient and permanent hypoparathyroidism after thyroidectomy].* Clin Ter, 2017. 168(4): p. e271-e277.
 87. **Walker, M.D. and S.J. Silverberg,** *Primary hyperparathyroidism.* Nat Rev Endocrinol, 2017.
 88. **Lee, F., J.J. Lee, W.C. Jan, et al.,** *Molecular pathways associated with transcriptional alterations in hyperparathyroidism.* Oncol Lett, 2016. 12(1): p. 621-626.
 89. **Westin, G., P. Bjorklund, and G. Akerstrom,** *Molecular genetics of parathyroid disease.* World J Surg, 2009. 33(11): p. 2224-33.
 90. **Koh, J., M. Dar, B.R. Untch, et al.,** *Regulator of G protein signaling 5 is highly expressed in parathyroid tumors and inhibits signaling by the calcium-sensing receptor.* Mol Endocrinol, 2011. 25(5): p. 867-76.
 91. **Costa-Guda, J., T. Tokura, S.I. Roth, et al.,** *Mitochondrial DNA mutations in oxyphilic and chief cell parathyroid adenomas.* BMC Endocr Disord, 2007. 7: p. 8.
 92. **Hall, J.E.,** *Guyton and Hall textbook of medical physiology.* 13th edition. ed. 2016, Philadelphia, PA: Elsevier. xix, 1145 pages.
 93. **Bray, R.A., P.W. Nickerson, R.H. Kerman, et al.,** *Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology.* Immunol Res, 2004. 29(1-3): p. 41-54.

94. **Stavropoulos-Giokas, C., A. Dinou, and A. Papassavas**, *The Role of HLA in Cord Blood Transplantation*. Bone Marrow Res, 2012: p. 485160.
95. **Erlich, H.**, *HLA DNA typing: past, present, and future*. Tissue Antigens, 2012. 80(1): p. 1-11.
96. **Crux, N.B. and S. Elahi**, *Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections?* Front Immunol, 2017. 8: p. 832.
97. **Marsh, S.G., E.D. Albert, W.F. Bodmer, et al.**, *Nomenclature for factors of the HLA system, 2010*. Tissue Antigens, 2010. 75(4): p. 291-455.
98. **Bontadini, A.**, *HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics*. Methods, 2012. 56(4): p. 471-6.
99. **Lawand, M., A. Abramova, V. Manceau, et al.**, *TAP-Dependent and -Independent Peptide Import into Dendritic Cell Phagosomes*. J Immunol, 2016. 197(9): p.3454-3463.
100. **Buhler, S., J.M. Nunes, and A. Sanchez-Mazas**, *HLA class I molecular variation and peptide-binding properties suggest a model of joint divergent asymmetric selection*. Immunogenetics, 2016. 68(6-7): p. 401-416.
101. **Borrego, F., J. Kabat, D.K. Kim, et al.**, *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. Mol Immunol, 2002. 38(9): p. 637-60.
102. **Robinson, J., J.A. Halliwell, H. McWilliam, et al.**, *IPD--the Immuno Polymorphism Database*. Nucleic Acids Res, 2013. 41(Database issue): p. D1234-40.
103. **Wagner, B., F. da Silva Nardi, S. Schramm, et al.**, *HLA-E allelic genotype correlates with HLA-E plasma levels and predicts early progression in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2017. 123(5): p. 814-823.
104. **Versluis, M.A.C., S. Marchal, A. Plat, et al.**, *The prognostic benefit of tumour infiltrating Natural Killer cells in endometrial cancer is dependent on concurrent overexpression of Human Leucocyte Antigen-E in the tumour microenvironment*. Eur J Cancer, 2017. 86: p. 285-295.
105. **Dulberger, C.L., C.P. McMurtrey, A. Holzemer, et al.**, *Human Leukocyte Antigen F Presents Peptides and Regulates Immunity through Interactions with NK Cell Receptors*. Immunity, 2017. 46(6): p. 1018-1029 e7.
106. **Goodridge, J.P., N. Lee, A. Burian, et al.**, *HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in a MHC-I antigen cross-presentation pathway*. J Immunol, 2013. 191(4): p. 1567-77.
107. **Murdaca, G., P. Contini, S. Negrini, et al.**, *Immunoregulatory Role of HLA-G in Allergic Diseases*. J Immunol Res, 2016. 2016: p. 6865758.
108. **Amiot, L., N. Vu, and M. Samson**, *Biology of the immunomodulatory molecule HLA- G in human liver diseases*. J Hepatol, 2015. 62(6): p. 1430-7.

109. **Boyson, J.E., R. Erskine, M.C. Whitman, et al.**, *Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002.99(25): p. 16180-5.
110. **ten Broeke, T., R. Wubbolts, and W. Stoorvogel**, *MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting*. Cold Spring Har Perspect Biol, 2013. 5(12): p. a016873.
111. **Hughes, A.L.**, *Evolution of introns and exons of class II major histocompatibility complex genes of vertebrates*. Immunogenetics, 2000. 51(6): p. 473-86.
112. **Roche, P.A. and K. Furuta**, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2015. 15(4): p. 203-16.
113. **van Lith, M., R.M. McEwen-Smith, and A.M. Benham**, *HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM*. J Biol Chem, 2010. 285(52): p. 40800-8.
114. **Koch, N., M. Zacharias, A. Konig, et al.**, *Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers*. PLoS One, 2011. 6(2): p. e17257.
115. **Baraliakos, X., N. Baerlecken, T. Witte, et al.**, *High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis, 2014. 73(6): p. 1079-82.
116. **Adler, L.N., W. Jiang, K. Bhamidipati, et al.**, *The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells*. Front Immunol, 2017. 8: p. 319.
117. **Denzin, L.K.**, *Inhibition of HLA-DM Mediated MHC Class II Peptide Loading by HLA-DO Promotes Self Tolerance*. Front Immunol, 2013. 4: p. 465.
118. **Turner, J.S., M. Marthi, Z.L. Benet, et al.**, *Transiently antigen-primed B cells return to naive-like state in absence of T-cell help*. Nat Commun, 2017. 8: p.15072.
119. **Griffioen, M., C.A. van Bergen, and J.H. Falkenburg**, *Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets*. Front Immunol, 2016. 7: p. 100.
120. **Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, et al.**, *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011.11(12): p. 823-36.
121. **Klein, L., B. Kyewski, P.M. Allen, et al.**, *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014.14(6): p. 377-91.
122. **Linscheid, C. and M.G. Petroff**, *Minor histocompatibility antigens and the maternal immune response to the fetus during pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2013.69(4): p. 304-14.
123. **Goulmy, E., R. Schipper, J. Pool, et al.**, *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. 334(5): p. 281-5.

124. **den Haan, J.M., L.M. Meadows, W. Wang, et al.,** *The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism.* Science, 1998. 279(5353): p. 1054-7.
125. **Popli, R., B. Sahaf, H. Nakasone, et al.,** *Clinical impact of H-Y alloimmunity* Immunol Res, 2014. 58(2-3): p. 249-58.
126. **Van Bergen, C.A., C.E. Rutten, E.D. Van Der Meijden, et al.,** *High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning.* Cancer Res, 2010. 70(22): p. 9073-83.
127. **Anton, L.C. and J.W. Yewdell,** *Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors.* J Leukoc Biol, 2014. 95(4): p. 551-62.
128. **Bloch, D.B., S.M. de la Monte, P. Guigaouri, et al.,** *Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body.* J Biol Chem, 1996. 271(46): p. 29198-204.
129. **Bloch, D.B., A. Nakajima, T. Gulick, et al.,** *Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator.* Mol Cell Biol, 2000. 20(16): p. 6138-46.
130. **Kadereit, S., D.R. Gewert, J. Galabru, et al.,** *Molecular cloning of two new interferon-induced, highly related nuclear phosphoproteins.* J Biol Chem, 1993. 268(32): p. 24432-41.
131. **Szostecki, C., H.H. Guldner, H.J. Netter, et al.,** *Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis.* J Immunol, 1990. 145(12): p. 4338-47.
132. **Dent, A.L., J. Yewdell, F. Puvion-Dutilleul, et al.,** *LYSP100-associated nuclear domains (LANDs): description of a new class of subnuclear structures and their relationship to PML nuclear bodies.* Blood, 1996. 88(4): p. 1423-6.
133. **Marquardsen, F.A., F. Baldin, F. Wunderer, et al.,** *Detection of Sp110 by Flow Cytometry and Application to Screening Patients for Venooclusive Disease with Immunodeficiency.* J Clin Immunol, 2017. 37(7): p. 707-714.
134. **Warren, E.H., N.J. Vigneron, M.A. Gavin, et al.,** *An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order.* Science, 2006. 313(5792): p.1444-7.
135. **Cano, F. and P.J. Lehner,** *A novel post-transcriptional role for ubiquitin in the differential regulation of MHC class I allotypes.* Mol Immunol, 2013. 55(2): p. 135-8.
136. **Wearsch, P.A. and P. Cresswell,** *The quality control of MHC class I peptide loading.* Curr Opin Cell Biol, 2008. 20(6): p. 624-31.
137. **Ingulli, E.,** *Mechanism of cellular rejection in transplantation.* Pediatr Nephrol, 2010.25(1): p. 61-74.
138. **Timm, S., W. Hamelmann, C. Otto, et al.,** *Influence of donor MHC class I antigen expression on graft survival after rat parathyroid allotransplantation.* Langenbecks Arch Surg, 2001.386(6): p.430-3.
139. **Simon, A., Z. Dosztanyi, E. Rajnavolgyi, et al.,** *Function-related regulation of the stability of MHC proteins.* Biophys J, 2000. 79(5): p. 2305-13.

140. **Vigneron, N. and B.J. Van den Eynde**, *Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex*. *Biomolecules*, 2014. 4(4): p. 994-1025.
141. **Micheletti, F., M. Bazzaro, A. Canella, et al.**, *The lifespan of major histocompatibility complex class I/peptide complexes determines the efficiency of cytotoxic T-lymphocyte responses*. *Immunology*, 1999. 96(3): p. 411-5.
142. **Hansen, T., G. Balendiran, J. Solheim, et al.**, *Structural features of MHC class I molecules that might facilitate alternative pathways of presentation*. *Immunol Today*, 2000. 21(2): p. 83-8.
143. **Busch, R., I. Cloutier, R.P. Sekaly, et al.**, *Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum*. *EMBO J*, 1996. 15(2): p. 418-28.
144. **Robinson, J.H. and A.A. Delvig**, *Diversity in MHC class II antigen presentation*. *Immunology*, 2002. 105(3): p. 252-62.
145. **Watts, C.**, *Antigen processing in the endocytic compartment*. *Curr Opin Immunol*, 2001. 13(1): p. 26-31.
146. **Villadangos, J.A. and H.L. Ploegh**, *Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge?* *Immunity*, 2000. 12(3): p. 233-9.
147. **Tagliamacco, A., M. Cioni, P. Comoli, et al.**, *DQ molecules are the principal stimulators of de novo donor-specific antibodies in nonsensitized pediatric recipients receiving a first kidney transplant*. *Transpl Int*, 2014. 27(7): p. 667-73.
148. **DeVos, J.M., A.O. Gaber, R.J. Knight, et al.**, *Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation*. *Kidney Int*, 2012. 82(5): p. 598-604.
149. **Spierings, E.**, *Minor histocompatibility antigens: past, present, and future*. *Tissue Antigens*, 2014. 84(4): p. 374-60.
150. **Hirayama, M. and E. Azuma**, *Major and minor histocompatibility antigens to NIMA: Prediction of a tolerogenic NIMA effect*. *Chimerism*, 2011. 2(1): p.23-4.
151. **Roy, D.C. and C. Perreault**, *Major vs minor histocompatibility antigens*. *Blood*, 2017. 129(6): p. 664-666.
152. **McCarroll, S.A., J.E. Bradner, H. Turpeinen, et al.**, *Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease*. *Nat Genet*, 2009. 41(12): p. 1341-4.
153. **Martin, P.J., D.M. Levine, B.E. Storer, et al.**, *Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease*. *Blood*, 2017. 129(6): p. 791-798.
154. **Liepe, J., F. Marino, J. Sidney, et al.**, *A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides*. *Science*, 2016. 354(6310): p. 354-358.
155. **Granados, D.P., C.M. Laumont, P. Thibault, et al.**, *The nature of self for T cells-a systems-level perspective*. *Curr Opin Immunol*, 2015. 34:p.1-8.
156. **JR, G.**, *Gross anatomy of the parathyroid glands*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1937. 44(2): p. 431-562.

157. **Özarmağan S, T.S.**, *Paratiroid hastalıkları*. Genel Cerrahi, ed. G. Kalaycı. 2002, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
158. **Oostvogels, R., H.M. Lokhorst, and T. Mutis**, *Minor histocompatibility Ags: identification strategies, clinical results and translational perspectives*. Bone Marrow Transplant, 2016. 51(2): p. 163-71.



EKLER

EK A: Etik Kurul Karar Yazısı



EK A

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sağlıklı, Hipertansiyon ve Adenomatöz Paratiroid Dokularında Minör ve Majör Histokompatibilite Antijenlerinin Ekspresyon Miktarlarının Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Özcan KARAMAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Çalışma Durumu		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Doç. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selhattin TUĞRUL	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Harun BAŞOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ayşe Arzu ŞAKUL	Tıbbi Farmakoloji	Medipol Üniversitesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA	Tıbbi Farmakoloji	Düzce Üniversitesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sultan ŞİMŞEK	Çalışan	Kurum Dışı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Aybüke EKİCİ	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Etik Kurul Başkanı
Doç. Dr. Özcan KARAMAN

Sayfa 3 / 3

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Beyza S. Göncü
Doğum Tarihi ve Yeri : 15/10/1985 İstanbul
E-posta : bsgoncu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans:** 2007, Haliç Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yükseklisans** 2010, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2011-2013 yılları arasında Texas Institute of Biotechnology Education and Research'de araştırmacı olarak çalıştı.
- 2016 yılından itibaren Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde araştırmacı olarak çalışmaktadır.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Beyza Goncu, Burcu Ozdemir, Harun Basoglu, Nur Ozten Kandas, Fahri Akbas, Cemile Kesgin Toka, Emrah Yucesan, Rumezta Kazancioglu, Erhan Aysan.** 2017. New Transport Solution For Parathyroid Allotransplantation. *European Society of Organ Transplantation Congress*, Eylül 23-24, 2017 Barselona, İspanya.
- **Beyza Goncu, Burcu Ozdemir, Erhan Aysan.** 2016. Bezmialem Taşıma Solüsyonu Patent başvuru numarası: 2016/15172.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR:

- **Yucesan E, Goncu B, Basoglu H, et al.** Fresh tissue parathyroid allotransplantation with short-term immunosuppression: 1-year follow-up. *Clin Transplant*. 2017;31:e13086.
- **Yucesan, E., H. Başoğlu, B. Göncü, et al.,** Mikroenkapsüle edilen paratiroid hücrelerinin *in-vitro* optimizasyonu. *Dicle Tıp Dergisi*, 2017; p. 373-380.
- **Beyza Goncu, Cemile Kesgin Toka, Burcu Ozdemir, Yunus Tasci, Emrah Yucesan, Rumezta Kazancioglu, Erhan Aysan.** 2017. Parathyroid Allotransplantation From Cadaveric Donor: Case Study. *European Society of Organ Transplantation Congress*, Eylül 23-24, 2017 Barselona, İspanya
- **Beyza S. Göncü, Emrah Yucesan, Burcu Özdemir, Cemile Kesgin Toka, Harun Başoğlu, Nur Özten Kandaş, Fahri Akbaş, Erhan Aysan.** 2017, Bezmialem Taşıma Solüsyonu®'nun Soğuk İskemi Süresince Verimliliğinin Paratiroid Hücreleri İncelenerek Belirlenmesi. *19. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Osmangazi Üniversitesi, Aralık 1-3, 2017 Eskişehir, Türkiye
- **Beyza S. Göncü, Emrah Yucesan, Önder Hüseyinbaş, Harun Başoğlu, Nur Özten Kandaş, Fahri Akbaş, Erhan Aysan.** 2017. Paratiroid Hücrelerinin *In Vitro* Mikroenkapsülasyonu. *19. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Osmangazi Üniversitesi, Aralık 1-3, 2017 Eskişehir, Türkiye.
- **Sezen Atasoy, Beyza S. Göncü, Volkan Gürkan.** 2017. Diz osteoartritlerinde sitokinlerin rollerinin belirlenmesi ve aday biyobelirteç araştırılması *XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, 26-29 Ekim 2017 Muğla, Türkiye.
- **Basaran Dulger, Nurcihan Hacıoglu, Beyza S. Goncu and Fahrettin Guçin,** "Antifungal Activity of Seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane) Against Some Clinically Relevant Fungal Pathogens", *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 22, No. 8 (2010), 6321-6324.
- **Basaran Dulger, Nurcihan Hacıoglu, Beyza S. Goncu and Fahrettin Guçin,** "Antibacterial Activity of the Seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane)", *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 22, No. 9 (2010), 6879-6883.