

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ
POPULASYONUNDA DÜŞÜK MOLEKÜLER
AĞIRLIKLI POLİPEPTİD-2 (LOW MOLECULAR
WEIGHT POLYPEPTIDE-LMP2) VE DÜŞÜK
MOLEKÜLER AĞIRLIKLI POLİPEPTİD-7 (LMP7)
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DENİZ MIHÇIOĞLU
TEMMUZ 2009**

**Güneydoğu Anadolu Bölgesi Populasyonunda Düşük
Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-2 (Low Molecular Weight
Polypeptide-Lmp2) ve Düşük Moleküler Ağırlıklı
Polipeptid-7 (Lmp7) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER**

**DENİZ MIHÇIOĞLU
TEMMUZ 2009**

ÖZET

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ POPULASYONUNDA DÜŞÜK MOLEKÜLER AĞIRLIKLIL POLİPEPTİD-2 (LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDE-LMP2) VE DÜŞÜK MOLEKÜLER AĞIRLIKLIL POLİPEPTİD-7 (LMP7) GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

MIHÇIOĞLU, Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Temmuz 2009, 46 sayfa

Bu çalışmada, Güneydoğu Anadolu populasyonunda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin incelenmesi ve allel/genotip frekanslarının belirlenmesi amaçlanmıştır. LMP2 (Low molecular weight polypeptide 2) ve LMP7 (Low molecular weight polypeptide 7) genleri Sınıf II bölgesine ait genlerdir. LMP2 ve LMP7, kısa ömürlü sitoplazmik proteinlerin çoğunun yıkımını gerçekleştiren proteozom kompleksinin büyük bileşenlerini oluşturan peptidleri kodlamaktadır. Oluşturulan, taşınan ve sunulan antijenik peptidlerin spektrumunun incelenmesi, hastalık asosiyasyon çalışmaları ve populasyon genetiği çalışmaları, LMP genlerindeki genetik varyasyonların fonksiyonel etkilerinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Çalışmaya, birbirleriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan toplam 100 sağlıklı birey katılmıştır. PCR-RFLP metodu kullanılarak polimorfizm analizleri gerçekleştirilmiş ve LMP2 ve LMP7 genlerinin allel ve genotip frekansları belirlenmiştir. LMP2 geni için genotip frekansları, R/R için % 40, R/H için % 29 ve H/H için % 31 olarak belirlenmiştir. Allel frekansları ise H alleli için 0,545, R alleli için 0,455 hesaplanmıştır. LMP7 geninin genotip frekansları, Q/Q için % 80, Q/K için % 12 ve K/K için % 0 olarak belirlenmiştir. Allel frekansları ise Q alleli için 0,94, K alleli için ise 0,06 olarak hesaplanmıştır. LMP2 geni genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesinden sapma göstermektedir ($\chi^2=13,87$, $p<0,005$). Diğer taraftan, LMP7 gen polimorfizmi için ise çalışılan populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu tespit edilmiştir. ($\chi^2 =0,46$, $p>0,5$)

Anahtar Kelimeler: MHC, LMP2, LMP7, genetik polimorfizm

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDE-2 (LMP2) AND LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDE-7 (LMP7) GENE POLYMORPHISMS IN SOUTHEASTERN ANATOLIAN POPULATION

MIHÇIOĞLU, Deniz

M.Sc. in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

July 2009, 46 pages

In this study, analysis of the LMP2 and LMP7 gene polymorphisms, determination of the allele and genotype frequencies in Southeastern Anatolia population was aimed. LMP2 (Low molecular weight polypeptide 2) and LMP7 (Low molecular weight polypeptide 7) genes belong to MHC-Class II region. LMP2 and LMP7 genes encode peptides forming the large components of the proteasome complex which degrades short-lived cytoplasmic proteins. Analysis of the spectrum of the peptides generated, transported and presented; disease association studies and population genetic studies are important for understanding the functional effects of genetic variations in LMP genes. A total of 100 healthy and unrelated individuals participated in this study. Polymorphism analyses were done by PCR-RFLP method and allele and genotype frequencies of LMP2 and LMP7 genes were determined. Genotype frequencies of LMP2 gene were found to be R/R % 40, R/H % 29 and H/H % 31. Allele frequencies were calculated as 0.545 for R and 0.455 for H allele. Genotype frequencies of LMP7 gene were determined as % 80 for Q/Q, % 12 for Q/K and % 0 for K/K. Allele frequencies were calculated as 0.94 for Q and 0.06 for K allele. In case of genotype distribution, the LMP2 gene polymorphism showed a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=13.87$, $p<0.005$) while the LMP7 gene polymorphism in the population appeared to be distributed in accordance to the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 =0.46$, $p>0.5$)

Key Words : MHC, LMP2, LMP7, genetic polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER' e,

Yüksek lisans eğitimim sırasında bana emeği geçen başta Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Çalışmalarında yardımını gördüğüm değerli arkadaşım Biyolog Selçuk KÖK' e,

Bana her zaman destek olan eşime ve aileme,

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
BÖLÜM:1 GİRİŞ	1
BÖLÜM 2: LİTERATÜR ÖZETLERİ	8
BÖLÜM 3: MATERYAL ve METOD	15
3.1. Örneklemeye.....	15
3.2. DNA İzolasyonu	15
3.3. LMP2 ve LMP7 Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu.....	17
3.4. Agaroz Jel Elektroföresi.....	19
3.5. LMP2 ve LMP7 Gen Polimorfizmlerinin RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği ile Analizi.....	21
3.6. Genotip Tayini	23
3.7. İstatiksel Analiz.....	24
BÖLÜM 4: ARAŞTIRMA BULGULARI	26
BÖLÜM 5: TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. 6p 21.1-21.3 üzerinde yerleşik MHC bölgesinin gen haritası.....	4
Şekil 1.2. T hücrenin hedef hücreye tutunmasında MHC sınıf I molekülü ve T hücre almaçı (reseptörü) (TCR) arasında peptid moleküllerinin rolü.....	5
Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik olarak gösterimi.....	18
Şekil 3.2. LMP2 geninin PCR ile amplifikasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi	21
Şekil 3.3. LMP7 geninin PCR ile amplifikasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi	21
Şekil 3.4. LMP2 gen polimorfizminin Hha I enzim kesimiyle analizi.....	24
Şekil 3.5. LMP7 gen polimorfizminin Bsm I enzim kesimiyle analizi	24
Şekil 4.1. Güneydoğu Anadolu populasyonu ve diğer populasyonlar arasındaki genetik uzaklıkları gösteren “Neighbour-Joining” dendogramı.....	34

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. LMP2 ve LMP7 genlerinin PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	19
Tablo 3.2. PCR Reaksiyonundaki Isı Döngüleri.....	19
Tablo 3.3. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri.....	22
Tablo 3.4. Kesim sonuçlarına göre LMP2 genotiplendirme	24
Tablo 3.5. Kesim sonuçlarına göre LMP7 genotiplendirme	24
Tablo 4.1. LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri için genotip dağılımları.....	27
Tablo 4.2. LMP2 gen polimorfizmi için genotip ve allel frekansları.....	29
Tablo 4.3. LMP7 gen polimorfizmi için genotip ve allel frekansları.....	29
Tablo 4.4. LMP2 ve LMP7 genleri genotip ve allel frekansları ve χ^2 ve P değerleri. 30	
Tablo 4.5. Farklı populasyonlarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin allel frekansları.....	31
Tablo 4.6. Populasyonlar arası standart genetik uzaklıklar	33
Tablo 4.7. LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri açısından populasyonların averaj heterozigotluk değerleri	35

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	Adenin
aa	aminoasit
bç	baz çifti
C	Sitozin
dk	dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
G	Guanin
GP	Geri primer
HLA	Human Leukocyte Antigens (İnsan Lokosit Antijenleri)
İP	İleri primer
LMP	Low Molecular Weight Polypeptide (Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptit)
lt	litre
Na ₂ EDTA	Sodyum EDTA
mg	miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MHC	Major Histocompatibility Complex (Ana Doku Uyuşum Bileşeni)
mM	milimolar
p	Anlamlılık değeri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	pikomol
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
T	Timin
TAP	Transporter Associated With Antigen Processing
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borik Asit EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Melting temperature
u	unit (birim)
V	Volt
µl	mikro litre
µM	mikro molar
µg	mikrogram
χ ²	Ki kare

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan doku antijenlerini kodlayan gen bölgesi, **Ana Doku Uyuşum Bileşeni**, MHC olarak adlandırılır. İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan bu bölgenin insandaki karşılığı, 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.1-21.3) yerleşmiş olup; yaklaşık 4 Mb'lık bir bölgeyi kapsar (Dalva, 2004). Günümüzde insan MHC bölgesi tamamen dizilenmiştir ve bu bilgi Ekim 1999 tarihli Nature dergisinde yayınlanmıştır (MHC Sequencing Consortium). MHC bölgesi, insan genomunun % 0,13'ünü teşkil eder ancak protein kodlayan genlerin yaklaşık % 0,5'i (>150) bu bölgede yer alır (Shiina vd., 2009). Bu bölge insan genomundaki gen açısından en yoğun ve en iyi tanımlanmış bölgelerden birisidir (Shiina vd., 2009).

İlk olarak beyaz kan hücrelerinde tanımlanan bu genler, insanda **İnsan Lokosit Antijenleri** ("Human Leukocyte Antigens") veya kısaca HLA genleri olarak da adlandırılır.

MHC gen ürünlerinin çoğu, edinsel bağışıklık cevap kapsamında yangı (inflatuvar yanıt), antijen işleme ve sunmada, doğal bağışıklık cevap kapsamında doğal öldürücü hücreler ve sitokinlerle olan etkileşimde görev alan uyarılar (ligandlar), almaçlar (reseptörler), etkileşim proteinleri, uyarı molekülleri ve transkripsiyon düzenleyicileridir (Shiina vd., 2009).

HLA bölgesinde (3,78 Mb) bugüne kadar sınıf I bölgesinin en telomerik bölümüne yerleşik olan BABBR1'den sınıf II bölgesinin en sentromerik bölümündeki KIFC1'e kadar toplam 253 bölge tanımlanmıştır (Şekil 1.1.) (Shiina vd., 2009).

MHC, kodlanan proteinlerin immünolojik özelliklerine göre **genişletilmiş Sınıf I**, **Sınıf I**, **Sınıf III**, **Sınıf II** ve **genişletilmiş Sınıf II** olarak beş alt bölgeye ayrılır

(Shiina vd., 2009). Bu bölgelerdeki bölge sayısı sırasıyla 4, 128, 75, 27 ve 19'dur (Shiina vd., 2009).

Genişletilmiş Sınıf I bölgesi; BABBR1, SUMO2P, MOG ve ZNP57 olmak üzere toplam 4 gen içerir (Shiina vd., 2009). Ancak, koku almaçları histon, tRNA ve çinko parmak protein gibi proteinleri kodlayan duplike genler genişletilmiş Sınıf I bölgesinin telomerik kısmında yer alırlar (Shiina vd., 2009).

Sınıf I bölgesi, MHC nin telomerik ucunda yer alır ve alfa, beta, kapa blok olmak üzere 3 ayrı bölümden oluşur (Dawkins vd., 1999). HLA-A, HLA-B, HLA-C olarak da tanınan 3 klasik transplantasyon antijen bölgesi, HLA-E, HLA-F, HLA-G olmak üzere 3 klasik olmayan antijen bölgesi ve yalancı gen (psödogen) veya kodlamayan gen bölümleri (HLA-S/17, -X, -N/30, -L/92, -J/59, -W/80, -U/21, -K/70, -16, -H/54, -90, -75) bu bölgede yer alır (Dawkins vd., 1999).

Sınıf I bölgesi 1.8 Mb'lık bir alanı kaplar ve 42 kodlanan gen, 12 gen adayı, 10 kodlamayan gen, 64 yalancı gen (psödogen) olmak üzere toplam 128 bölge içerir (Shiina vd., 2009).

Sınıf III bölgesi, Sınıf I ve Sınıf II bölgesi arasında toplam 0,9 Mb'lık bir alanda yerleşiktir. 55'i protein kodlayan gen ve 5'i yalancı gen (psödogen) olmak üzere toplam 75 bölge içerir (Shiina vd., 2009).

MHC molekülleri doku uyumu ile doğrudan ilişkili değildir (Shiina vd., 2009). Ancak HLA gen bölgesinde ifade edilen antijenler olup bazı kompleman elemanlarını (komponentlerini), yangı moleküllerini (C2, C4 A, C4 B, CFB, HSP, LTA, LTB, MIC A, MIC B ve TNF vb.) içerirler (Dalva, 2004).

Sınıf III genlerinin ürünleri genellikle transkripsiyonun düzenlenmesi, hamarat ("housekeeping"), biyosentez, elektron taşınımı ve hidrolaz işlevi, usta (çaperon) işlevi ve uyarı iletimi gibi hücresel süreçlerde önemli rollere sahiptirler (Shiina vd., 2009).

Sınıf II bölgesi ise sentromere yakın yerleşik olup toplam 0,7 Mb'lık bir alanı kapsar (Shiina vd., 2009). HLA-DP, HLA-DN, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DQ ve HLA-DR bölgelerinin yanısıra çeşitli yalancı genleri (psödogenleri), LMP1, LMP2, TAP1, TAP2 gibi antijen işlenmesinde rol alan genleri içerir (Shiina vd., 2009).

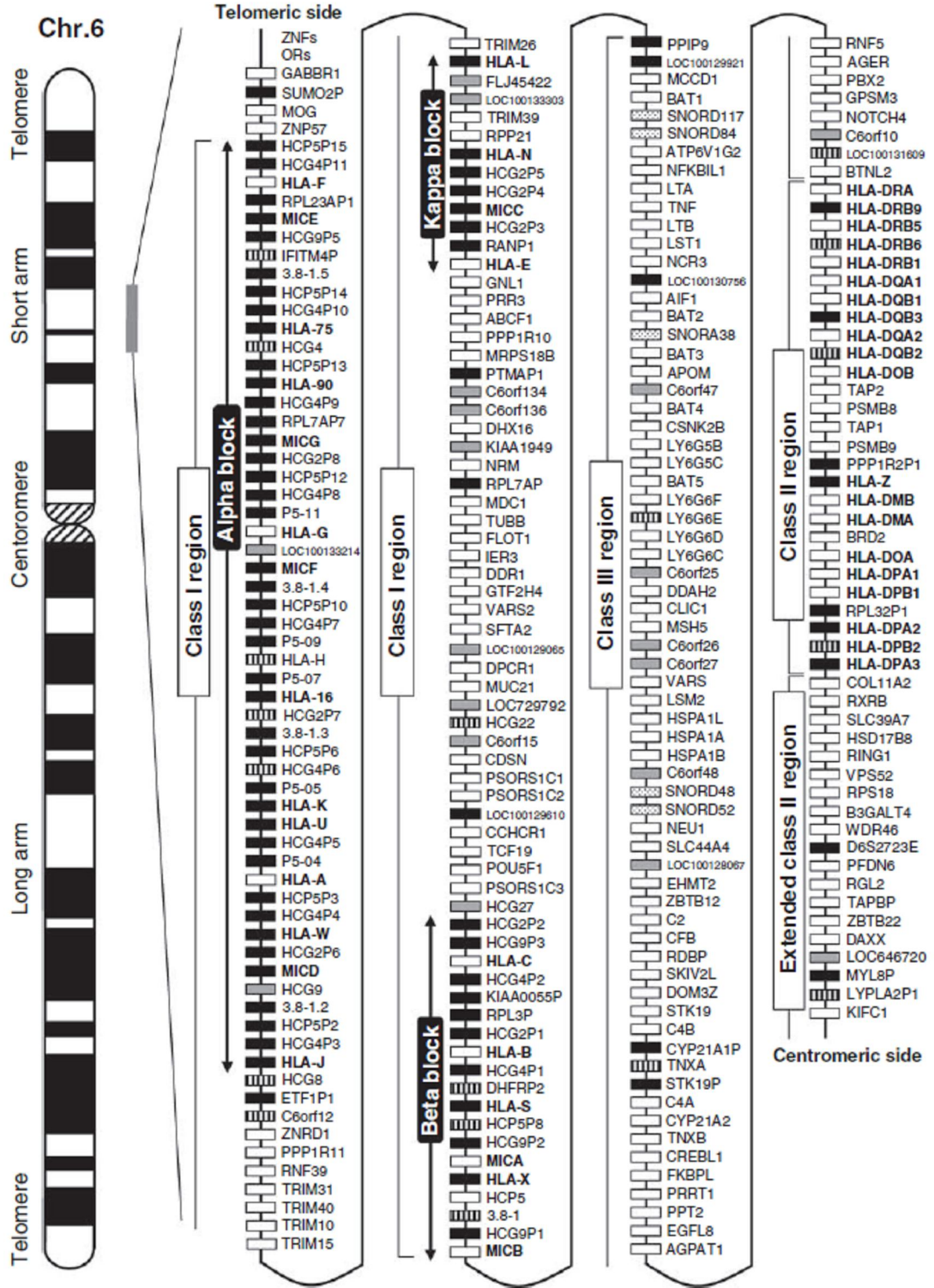
Bu bölgede, 17'si protein kodlayan gen ve 5'i yalancı gen (psödogen) olmak üzere toplam 27 bölge bulunmaktadır (Shiina vd., 2009).

Genişletilmiş Sınıf II bölgesi, 0,2 Mb'lık bir alanı kaplar ve toplam 19 bölge (15'i protein kodlayan gen, 2'si yalancı gen) içerir (Shiina vd., 2009).

Sınıf I ve sınıf II MHC genleri, transplantasyon bağışıklığı açısından en büyük öneme sahip olan genlerdir (Beksaç, 2004). MHC bölgesinin ne kadar polimorfik ve karmaşık olduğunun ortaya çıkmasıyla HLA insan immünobiyolojisinde önemli bir yer teşkil etmeye başlamıştır (Beksaç, 2004).

MHC sınıf I molekülleri, vücuttaki tüm çekirdekli hücrelerde ifade olur ve endojen antijen sunumunda görev alırlar (Beksaç, 2004). Ağır zincirleri kodlayan Sınıf I genleri, HLA-A, -B, -C, -E, -F ve -G işlevsel HLA izoformlarını oluşturur (Beksaç, 2004). HLA-A, -B ve -C klasik sınıf I antijenlerini sentezletir, diğer yandan klasik olmayan HLA-E, -F, -G ise doğal öldürücü hücreler ile ilişkili bağışıklık cevapta görev almaktadırlar (Beksaç, 2004). HLA-H, -J, -K ve -L olarak isimlendirilen yalancı genlerin henüz herhangi bir immünolojik görevi bildirilmemiştir (Beksaç, 2004). MHC sınıf I moleküllerinin esas görevleri hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır (Beksaç, 2004).

Antijen bağlama bölge alanları her sınıf I molekülü için farklılık gösterir ve her bir molekül belirli sayıdaki antijenik peptid parçasını bağlayabilir (Yakut, 2004). Molekülün yapısındaki alfa sarmallar bağlanan antijenik parçayla birlikte sadece Sınıf I moleküllerini taşıyan CD8T hücreleri üzerindeki T hücre almaçı tarafından tanınan uyarıcı meydana getirirler (Bilbao vd., 2002).

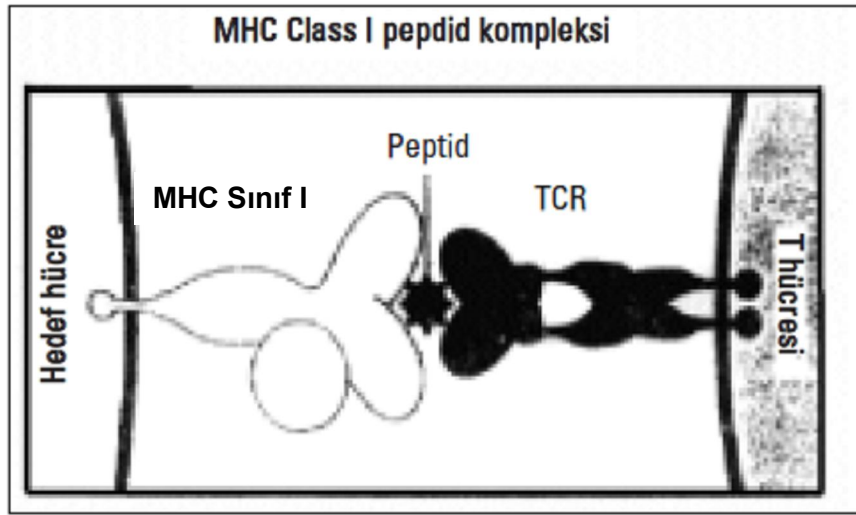


Şekil 1.1. 6p 21.1-21.3 üzerinde yerleşik MHC bölgesinin gen haritası (Shiina vd., 2009).

Lenfositler, antijenlere özgün bir bağışıklık yanıt oluşmasından sorumlu hücrelerdir (Dalva, 2004). T lenfositler kanda bulunan lenfositlerin % 80'ini oluştururlar (Dalva,

2004). T lenfositlerin iki alt grubu vardır. Bunlar yardımcı ve öldürücü T lenfositlerdir (Dalva, 2004). Öldürücü T lenfositler (CD8), sadece MHC sınıf I ile eşleşmiş molekülleri tanıırken, yardımcı T lenfositler (CD4) MHC sınıf II ile ilişkili olanları tanır (Dalva, 2004).

CD8 T lenfosit hücrelerinin bir antijeni tanıyabilmesi için o antijenik peptidin Sınıf I moleküllerine bağlanmış olması gerekir ve bu durum HLA restriksiyonu olarak bilinir (Bilbao vd., 2002). Belirli bir T lenfositin antijen almaçı belirli bir antijenik peptidi ancak belirli bir sınıf I molekülü aracılığıyla bağlayabilir (Bilbao vd., 2002). Tanıma gerçekleştiği zaman öldürücü T hücreleri (CD8) antijenik peptidi taşıyan hedef hücreyi öldürürler (Bilbao vd., 2002).



Şekil 1.2. T hücresinin hedef hücreye tutunmasında MHC sınıf I molekülü ve T hücre almaçı (TCR) arasında peptid moleküllerinin rolü (Yakut, 2004).

Sınıf III molekülleri klasik kompleman sisteminin C2, C4 faktörleri ile alternatif yoldaki “properdin faktör-B” leri içerir (Weber vd., 2001). Sınıf III molekülleri çözünebilir değildirler (Yakut, 2004). Transplantasyon antijenleri olarak rol oynamazlar ve T hücrelerine antijen tanıtmazlar (Yakut, 2004).

Sınıf II molekülleri büyük ölçüde bağışıklığa yetkinlik (immunokompotent) hücrelerinde, B lenfositlerde, antijen sunan hücrelerde (makrofaj, Langerhans hücreleri, dendritik hücreler) ve insanlarda aktive olmuş T hücrelerinde bulunurlar (Bixby ve Yannelli, 1998). Bunun yanı sıra, normalde sınıf II molekülü taşımayan

istirahat halindeki T hücreler, endotelial hücreler ve tiroid hücreleri gibi hücreler bunları taşımaları için harekete geçirilebilirler (Bixby ve Yannelli, 1998).

Bu normal olmayan taşıma işleminin HLA ile ilgili hastalıklarda önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Bixby ve Yannelli, 1998). Sınıf II moleküllerinin sınıf I moleküllerine benzer görevleri vardır (Bixby ve Yannelli, 1998). En önemli farklılık ise, sınıf I molekülleri genellikle endojen kökenli peptidleri, sınıf II molekülleri ise ekzojen kökenli peptidleri bağlayarak hücre zarına taşınması ve seçiliminde rol oynamalarıdır (Beksaç, 2004). Bir sınıf II molekülünün fonksiyonu bağışıklık cevabın başlangıcında aktif antijenik peptid parçalarını CD4 T lenfositlere sunmaktır (Beksaç, 2004). CD4 T lenfositler, tıpkı CD8 – sınıf I ilişkisinde olduğu gibi, ancak sınıf II molekülleri aracılığıyla peptid parçalarını tanıyabilirler (Beksaç, 2004).

Sınıf I ve sınıf II moleküllerinin yapısal farklılıkları da bağlayacakları peptidin özelliklerini ve bağlanma gücünü farklı kılmaktadır (Beksaç, 2004). Sınıf I moleküllerinin daha kıvrımlı ve uçları kapalı yapısı sınıf II'ye oranla daha küçük peptid parçalarının bağlanmalarına olanak sağlar (Beksaç, 2004).

LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 gibi antijen işlenmesinde görev alan proteinleri kodlayan genler de MHC sınıf II bölgesinde yer almaktadırlar (Çarin, 2004). **LMP2** (Low molecular weight polypeptide 2) ve **LMP7** (Low molecular weight polypeptide 7) genleri, proteozom yapısının bileşenlerini oluşturan peptidleri kodlamaktadır (Çarin, 2004).

Hücrelerde proteinlerin yıkımını sağlayan iki büyük yol vardır (Çarin, 2004). Bunlardan birisi lizozomun asidik ortamında gerçekleşen lizozomal proteoliz diğeri ise ubiquitin- proteozom yıkım yoludur (Çarin, 2004). Çok sayıda ubiquitin ile işaretlenmiş olan protein, çok sayıda alt birimden oluşmuş olan proteaz sistemi olan proteozom tarafından yıkılır (Çarin, 2004).

Endojen proteinler ubiquitin ile bağlanarak proteozoma yönlendirilir (Çarin, 2004). Proteozom, kısa ömürlü sitoplazmik proteinlerin çoğunun yıkımını gerçekleştirmektedir (Çarin, 2004). Burada 8-10 aa uzunluğunda kısa peptidlere yıkılan endojen proteinler TAP (Transporter associated with antigen processing) heterodimeri aracılığı ile endoplazmik retikulum lümenine aktarılırlar (Çarin, 2004).

TAP molekülleri zarlar arasında, oligopeptid ve daha büyük proteinler gibi farklı maddelerin taşınmasını sağlamaktadır (Çarin, 2004). TAP1/TAP2 molekülleri endoplazmik retikulum zarında, sitoplazmadan lümene peptid taşıyıp yerleştiren bir sistem oluştururlar (Çarin, 2004). Taşınmış olan peptidler sınıf I molekülüne yüklenirler (Çarin, 2004). Endoplazmik retikuluma ayrılan bu yapılar golgi sistemine gelir ve oradan taşıyıcı veziküller ile hücre zarına taşınarak sitotoksik T lenfositlerine sunulurlar (Çarin, 2004).

Ana Doku Uyuşum Bileşeni (MHC) sınıf II bölgesinde yerleşik olan LMP ve TAP genleri MHC sınıf I ile ilişkili endojen peptidlerin üretimi ve endoplazmik retikuluma taşınmasından sorumludur (Faucz vd., 2000).

LMP genleri HLA genleri kadar olmasa da polimorfik genlerdir (Faucz vd., 2000). Oluşturulan ve sunulan antijenik peptidlerin spektrumunun incelenmesi, ve populasyon genetiği çalışmaları, LMP genlerindeki genetik varyasyonların fonksiyonel etkilerinin anlaşılması için oldukça önemlidir (Faucz vd., 2000).

Bu tez çalışmasında, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden sağlıklı ve birbirleriyle akrabalık ilişkisi olmayan 100 bireyden örnekleme yapılmıştır. Tezin amacı, Güneydoğu Anadolu populasyonunda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin incelenmesi ve allel/genotip frekanslarının belirlenmesidir. Bu çalışmada incelenen LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri daha önce Türk populasyonunda incelenmemiş olduğu için allel/genotip frekansları hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. LMP gen polimorfizmlerinin incelenmesi ve literatürdeki diğer populasyonlara ait verilerle karşılaştırılması ile populasyonlar arasındaki genetik uzaklık hakkında da bilgi sahibi olunması mümkündür.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

MHC antijenleri transplantasyonda, nakil dokunun reddedilmesinde başlıca belirleyicidirler (Yakut, 2004). Aynı MHC moleküllerini taşıyan bireyler birbirlerinden doku alabildikleri halde MHC molekülleri farklı bireyler nakil dokularını şiddetle reddederler (Yakut, 2004).

MHC gen bölgesinin temel fonksiyonu organizmayı zararlı enfeksiyöz ajanlara karşı korumak, zarar görmüş, ölmekte olan veya enfekte hücreleri dağıtmaktır (Shiina vd., 2004). MHC genomik bölgesindeki yüksek düzeyde polimorfizm ve heterozigotluk, bağışıklık sistemine patojen çeşitliliği ve değişkenliğine karşı seçici bir avantaj sağlamaktadır (Shiina vd., 2004). Diğer taraftan yüksek polimorfizm ve mutasyon oranı, otoimmün hastalıklar ve diğer genetik hastalıkların oluşması için risk oluşturmaktadır (Shiina vd., 2004). 1967'de HLA-B antijenlerinin Hodgink's lenfoma hastalarında artmış olduğunu gösteren ilk çalışmadan bu yana yüzlerce otoimmün ve enfeksiyon hastalığı MHC bölgesi ile ilişkili bulunmuştur (Shiina vd., 2004).

HLA antijenlerinin hastalıklara yol açış mekanizmaları ile ilgili değişik teoriler mevcuttur (Yılmaz, 1996):

- HLA antijenlerinin hastalıklara yol açan etmene yapısal benzerlik göstermesi
- HLA antijenleri tarafından kontrol edilen bağışıklık yanıt genlerinin aşırı ya da zayıf reaksiyon göstermeleri
- HLA bölgesindeki proteinlerde bozukluk oluşu ya da proteinlerin yokluğu
- HLA sınıf III bölgesindeki genlerle ilgili kompleman sisteminde varolan bozukluklar (C2, C4 yetersizliği)
- HLA sınıf II antijenlerinin anormal ifadesi (ekspresyonu)

- HLA antijenlerinin patojen için almaç özelliği göstermesi
- HLA, LMP ve TAP gen polimorfizmleri ile hastalıklara yatkınlık ve direnç arasındaki ilişki bugüne kadar çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur:
- LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin İnsüline Bağımlı Diyabet gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, Güneydoğu Amerika bölgesinden 198 İnsüline Bağımlı Diyabet hastası ve 195 sağlıklı birey analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, İnsüline Bağımlı Diyabet hastalığının LMP7 gen polimorfizmi ile güçlü bir ilişki içinde olduğu, LMP2 gen polimorfizminin ise sadece HLA DR4-DQB1*0302 haplotipi taşıyan bireylerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Deng vd., 1995).
- Chevrier vd. (1997), HLA-DPB1,- DRB1, - DMA, - DMB, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 genlerinin İdiyopatik ve Sekonder Membranöz Nefropati üzerine etkisini inceleyen bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, gen polimorfizmleri 178 hasta ve 100 sağlıklı bireyde analiz edilmiş ve HLA-DPB, -DMB, LMP2, LMP7 ve TAP2 fenotip frekanslarının hasta ve sağlıklı bireylerde benzerlik gösterdiği ancak TAP1 geninin Sekonder Membranöz Nefropati ile ilişkili olduğu saptanmıştır.
- Romatoid Artrit hastalığı ile LMP ve TAP genleri arasındaki ilişki başka bir çalışma ile araştırılmış ve anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Vinasco vd., 1998).
- Hepatit C enfeksiyonu ile TAP2 gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Hepatit C virüsü ile enfekte olmuş 145 hasta, 36'sı taşıyıcı, 109'u ise kronik karaciğer hastası olmak üzere iki gruba ayrılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, taşıyıcılarda bulunan TAP2*0103 frekansının, kronik karaciğer hastalarındakinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kuzushita vd., 1999).
- Bir başka çalışmada, Sarkoidoz hastalığı ile TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada, 117 beyaz ırka mensup İngiliz Sarkoidoz hastası, 290 sağlıklı İngiliz birey, 87 Slovak kökenli Polonyalı sarkoidoz hastası ve 158 sağlıklı Polonyalı birey yer almıştır. Çalışma sonucunda, TAP2 gen polimorfizmi için, hem İngiliz hasta bireyler ve kontrol grubu arasında, hem de Polonyalı hasta bireyler ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir. TAP1 gen polimorfizmi için İngiliz ve Polonyalı kontrol grupları karşılaştırıldığında

iki grup arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir. Ayrıca ek olarak TAP2 gen polimorfizmi İngiliz ve Polonyalı hasta grupları arasında incelenmiş ve anlamlı bir fark bulunmuştur (Foley vd., 1999).

- İshihara vd. (1999), yaptıkları çalışma sonucunda Sarkoidoz ve Behçet hastalığı ile LMP7 geni arasında bir ilişki tespit edememişlerdir.
- Ankilozan Spondilit (AS) hastalığı ile TAP1 ve TAP2 genleri arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmada, 44 İspanyol AS hastası, 61 rastgele seçilmiş yetişkin sağlıklı birey ve 35 HLA-B27 pozitif sağlıklı birey yer almıştır. Çalışma sonucunda, TAP1B allel frekansının hasta gruplarında anlamlı olarak kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. TAP2 alleli ile ilgili bir fark gözlenmemiştir (Fraile vd., 2000).
- IgA nefropati ve Multiple Skleroz hastalığı ile TAP1, TAP2, LMP2, HLA-DMA ve HLA-DMB genlerinin arasındaki ilişki incelenmiş ancak IgAN ve MS hastalıkları ile bu genler arasında bir ilişki bulunmamıştır (Xiaochun vd., 2000).
- Atopik dermatit hastalığında TAP ve LMP genlerinin polimorfizmleri ve HLA-A,B allellerinin dağılımı incelenmiştir. 53 Koreli atopik dermatit hastası ve 153 sağlıklı bireyin yer aldığı çalışma sonucunda, LMP2 ve LMP7 genlerinin hasta ve sağlıklı bireylerde benzer dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, TAP1 geninin allel, genotip ve fenotip frekanslarının hasta ve sağlıklı bireylerde farklılık göstermediği, ancak TAP2 ve HLA-A24 geninin frekansının hasta bireylerde sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2001).
- LMP7 gen polimorfizminin kronik hepatit C hastalarının interferon tedavisine verdikleri yanıtı etkileyen önemli bir konakçı faktörü olduğu bildirilmiştir (Sugimoto vd., 2002).
- TAP gen polimorfizmlerinin Graves hastalığına etkisi Çin populasyonunda incelenmiştir. Çalışma sonucunda, TAP1D ve TAP2A haplotip frekanslarının sağlıklı bireylerde, hasta bireylere oranla daha yüksek olduğu, TAP1C ve TAP2F haplotip frekanslarının sağlıklı bireylerde, hasta bireylere oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Cai vd., 2002).

- Zhang vd. (2002a), TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmlerinin Doğu Fransa popülasyonunda Romatoid Artrit hastalığı ile ilişkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, TAP1 ve TAP2 genleri ile RA arasında zayıf bir ilişki belirlenmiştir.
- TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmlerinin insanda alveolar ekinokokkus (AE) hastalığı ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda, TAP2 geninin 665 kodonu ile AE hastalığı arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir (Zhang vd., 2002b).
- Gerçeker vd (2002), tarafından yapılan bir çalışmada kistik fibrozis fenotipinde TAP1 ve TAP2 genlerinin belirleyici etkileri araştırılmış ve TAP1 geninin 333 ve 637. pozisyonlarındaki, TAP2 geninin ise 665. pozisyonundaki polimorfizmlerin allel/genotip frekanslarında sağlıklı ve hasta bireyler arasında önemli bir fark gözlemlendiği bildirilmiştir.
- Finlandiya popülasyonunda, yetişkin Tip I Şeker hastalarında TAP2 gen polimorfizminin analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, Tip I şeker hastalığının TAP2 geninin 651. kodonu ile bir ilişki içerisinde olduğu belirlenmiştir (Penforis vd., 2002).
- Gostout vd. (2003), TAP1 ve TAP2 genlerinin rahim ağzı kanseri ile ilişkisini incelemişler ve bu genlerle rahim ağzı kanseri arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.
- TAP ve HLA-DM genlerinin sedef hastalığı ile ilişkisi incelenmiş ve belirli TAP ve HLA-DM allellerinin sedef hastalığına sebep olabileceği belirlenmiştir (Pyo vd., 2003).
- Kuzeybatı Kolombiyada TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmleri sistemik lupus eritematozus hastalarında incelenmiş, TAP2 bölgesinin hasta bireylerde duyarlılığı etkilediği belirlenmiş ancak belirgin bir etkisinin olduğu ispatlanamamıştır (Correa vd., 2003)
- Casp vd. (2003), vitiligo patogenezinde etken olan antimelanosit otoimmün yanıtta LMP ve TAP genlerinin rolü olabileceğini bildirmişlerdir.
- Yapılan bir başka çalışmada, LMP2 gen polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, LMP2 ekspresyonunun Alzheimer

hastalığından etkilenmiş dokularda, etkilenmemiş dokulara oranla daha fazla gözlemlendiği belirlenmiştir (Mishto vd., 2004).

- LMP gen polimorfizminin spondiloartrit hastalığı üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, LMP2 ve LMP7 genlerinin allel frekansları sağlıklı ve hasta bireylerde benzer dağılım göstermiştir. Genotip frekansı açısından LMP7 geni, hasta ve sağlıklı bireyler arasında önemli bir fark göstermezken, LMP2 genine ait genotiplerin spondiloartrit hastalığının gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir (Vargas-Alarcon vd., 2004).

- LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin Hepatit B virüs enfeksiyonuna etkisi incelenmiş ve LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin Hepatit B virüs enfeksiyonu için önemli bir konakçı faktör olduğu belirlenmiştir (Dai vd., 2005).

- Başka bir çalışmada, LMP7 ve TAP2 gen polimorfizmlerinin Çin'de insidansı yüksek olan yemek borusu kanseri üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, LMP7 ve TAP2 genlerinin yemek borusu kanseri gelişimi için risk faktörü olduğu ve HPV (human papilloma virus) ile enfekte olan kişilerde tümör oluşumunu etkilediği öne sürülmüştür (Cao vd., 2005)

- Kramer vd. (2007), tarafından LMP ve TAP genleri ile sedef hastalığı arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışma sonucunda, LMP ve TAP genlerinin alleleri ile sedef hastalığı arasında güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

- LMP ve TAP genlerinin rahim ağzı kanseri ile ilişkisi incelemiş ve LMP7 ve TAP2 genlerinin rahim ağzı kanseri riskini arttırdıkları belirlenmiştir (Mehta vd., 2007).

- Çin popülasyonundaki Hepatit B virüs enfeksiyonu riskinin LMP ve TAP genlerinin polimorfizmleri ile ilişkisi incelenmiş ve LMP7, TAP1 ve TAP2 genleri ile Hepatit B enfeksiyonu arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Changqing vd., 2007).

- Doğru vd. (2007), TAP gen polimorfizmlerinin çocuklardaki idiyopatik bronşektazi ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmlerinin genotip frekanslarının hasta ve sağlıklı bireyler arasında

farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bu genlerin bronşektazi hastalığının etiyopatogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Hastalık ilişkilendirme çalışmaları dışında, LMP ve TAP gen polimorfizmleri sağlıklı populasyonlarda da çalışılmış ve populasyonlara özgü allel/genotip frekansları belirlenmiştir:

- Faucz vd. (2000), üç farklı Brezilya populasyonunda (Kaingang, Guarani Amerindian, ve Paraná Kafkas populasyonu) TAP1, TAP2, LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin allel ve haplotip frekanslarının yanı sıra bağlantı eşitsizliğini incelemiş, Hardy-Weinberg dengesini test etmişlerdir. Çalışmaya, Guarani populasyonundan 93, Kaingang populasyonundan 241 ve Kafkas populasyonundan 93 birey katılmıştır. Çalışmanın sonucunda Guarani ve Kaingang populasyonlarının LMP ve TAP genleri açısından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Kafkas (Beyaz ırk) populasyonu ise Avrupa'daki ve diğer populasyonlardaki Kafkas (Beyaz ırk) populasyonları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmanın sonuçlarına göre, TAP-LMP bölgesindeki genlerin birlikte evrimleşmediği hipotezi desteklenmiştir ve allel frekansları incelendiğinde önemli bir seleksiyon olmadığı ve genotip frekanslarının da Hardy-Weinberg dengesine uyumlu dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

- LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri Meksika toplumunda da incelenmiştir. Çalışmada, 312 Meksikalı (95 Meksika Mestizo, 48 Nahua, 56 Mazatec, 50 Teenek, ve 63 Mayo) yetişkin birey yer almıştır. Bu populasyonlarda, LMP2 ve LMP7 polimorfizmleri benzer dağılım göstermiştir. Populasyonlar kendi içinde karşılaştırıldığında, Nahua ve Mayo populasyonlarında LMP2-H/H genotipinin frekansı en yüksek, LMP2-H/R genotipinin frekansı ise en düşüktür. LMP7-K/K genotipi Nahua, Teenek ve Mayo populasyonlarında bulunmamakta, sadece Mazatec populasyonundan bir yetişkin bireyde bulunmaktadır. Çalışma sonucunda, Meksikalı Mestizoların İspanyol ve Meksika kökenli Amerikalılarla genetik yakınlık gösterdiği belirlenmiştir (Vargas-Alarcon vd., 2002).

- Gerçeker ve Özgüç (2002), tarafından yapılan bir çalışmada ise, TAP1 ve TAP2 genlerindeki bazı polimorfizm frekansları Anadolu populasyonunda belirlenmiştir. Çalışmada TAP1-333, TAP1-637, TAP2-379, TAP2-565 ve TAP2-665

polimorfizmlerinin allel frekansları TAP1A (%75), TAP1C (%10.5), TAP1D (%8.5) ve TAP1B (%5.5) olarak belirlenmiştir. TAP2 geni için ise, allel frekansları TAP2A (%72), TAP2C (%24.5), TAP2E (%2), TAP2D (%1) ve TAP2B (%0.5) bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, TAP1 ve TAP2 allel frekansları dikkate alınarak Anadolu popülasyonu ile Japonya, Fransa, Almanya, Sardinya, Amerika (beyaz ırk), Guarani ve Kaingang popülasyonlarının genetik uzaklığı belirlenmiştir. TAP1 allellerinden, TAP1A'nın tüm popülasyonlardaki en yaygın allel olduğu belirlenmiştir. TAP1D sadece Anadolu ve Alman popülasyonunda gözlenmiştir. TAP1C diğer popülasyonlar içindeki en yüksek frekanslı allel, TAP1B ise en düşük frekanslı allel olarak gözlenmiştir. TAP2 allellerinden, TAP2B diğer popülasyonlar içinde en düşük frekansa, TAP2C ise en yüksek frekansa sahiptir. Bu frekanslardan yararlanılarak popülasyonlar arası genetik uzaklık hesaplandığında, Anadolu popülasyonunun Avrupa popülasyonuna yakın olduğu, Kaingang ve Guarani popülasyonlarının ise diğer popülasyonlara en uzak popülasyon olduğu belirlenmiştir.

- Bir başka çalışmada, Çin Han popülasyonunda TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmleri incelenmiştir. Çalışmada, Güney ve Kuzey Çin bölgesinde yaşayan 339 sağlıklı birey yer almıştır. Çalışma sonucunda, TAP1 geninin Guarani, Kaingang, ve Anadolu popülasyonları dışındaki diğer popülasyonlarla benzerlik gösterdiği, TAP2 geninin ise diğer popülasyonlardan önemli derecede farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, TAP1 ve TAP2 genlerinin farklı popülasyonlar için insan genetiği ve bağlantı analizi gibi çalışmalarda genetik belirleyici olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Feng vd., 2008).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Örnekleme

Güneydoğu Anadolu Bölgesi populasyonunu temsil edecek şekilde akrabalık ilişkisi olmayan 100 sağlıklı bireyden periferik kan örneği alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen bireylerin, 55'i kadın, 45'i erkektir. Erkek / kadın oranı 1: 1,2'dir. Yaşları 17-58 arasında değişmektedir. Yaşlarının medyan değeri 21'dir.

Kan örnekleri, 10 ml steril EDTA'lı tüpler içerisine alınmıştır. Örnekleme yapılırken Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni kapsayacak şekilde yapılmasına dikkat edilmiştir. Gaziantep, Diyarbakır, Şanlıurfa, Adıyaman, Mardin, Siirt, Batman ve Şırnak Güneydoğu Anadolu Bölgesi illeri olarak kabul edilmiş ve örnekleme buna göre yapılmıştır. Örnek alımı sırasında kişilere çalışmanın amacı, izlenecek yöntem ve risk ve faydalar hakkında bilgiler verilmiş ve yazılı onamları alınmıştır.

Çalışmamız, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (30.06.2008, Karar no: 06-2008/118).

3.2. DNA İzolasyonu

Örnekleme sırasında bireylerden alınan 10 cc periferik kandan yüksek tuz konsantrasyonu DNA'nın çöktürülmesi metodu kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüksek miktarda DNA eldesine olanak sağlayan, kolay uygulanabilir, ekonomik ve biyogüvenlik açısından avantajlı bir yöntem olduğu için bu yöntem tercih edilmiştir.

DNA izolasyonu için hazırlanan solüsyonların içerikleri aşağıda verilmiştir:

▪ **Çekirdek Lizis Tamponu (pH: 8.2)**

10 mM Tris-HCL	1,576 g
400 mM NaCl	23,4 g
2 mM Na ₂ EDTA	0,7 g

Distile su ile çözülerek 1 lt'ye tamamlanmıştır.

▪ **SDS %10**

SDS	10 g
-----	------

Distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

▪ **Amonyum Asetat**

Amonyum Asetat	148 g
----------------	-------

Distile su ile çözülerek 200 ml'ye tamamlanmıştır.

▪ **TE tampon çözeltisi (pH: 7.5)**

1 mM Tris-HCL	0,394 g
1mM Na ₂ EDTA	0,093 g

Distile su ile çözülerek 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra DNA izolasyonu için aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirilmiştir:

- 10 cc kan 50 ml'lik tüplere alınarak üzerine 40 ml soğuk steril distile su eklendi ve eritrositleri patlatmak amacıyla tüpler 1-2 dk aşağı yukarı çırpıldı.
- Tüpler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.(P Selecta Centronic –BL II Santrifüj)
- Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hacim 25 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi, pellet çözülmeye kadar tüpler çırpıldı.

- Örnekler, 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 3 ml Çekirdek Lizis tamponu, 200 µl Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 150 µl Proteinaz K eklendi ve karışım vorteks ile homojenize edildi.
- Tüpler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- Tüplerin içerisine 2 ml amonyum asetat eklendikten sonra 1 dk sallandı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Örnekler 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant toplanarak başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine toplam örnek hacminin 2 katı kadar etanol eklendi.
- Tüpler yavaşça döndürülerek DNA'nın toparlanması sağlandı.
- DNA 500 µl TE (Tris-EDTA) tamponunda çözdürüldükten sonra kullanılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı.

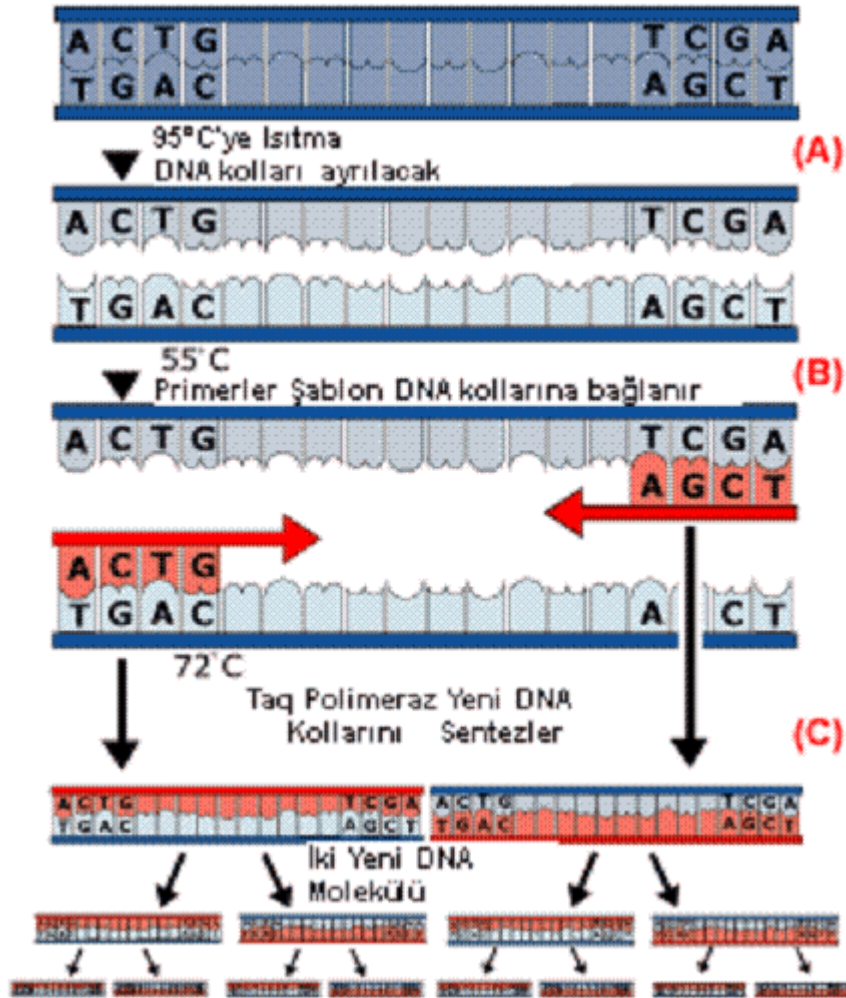
3.3. LMP2 ve LMP7 Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayarak DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. PCR'nin prensibi; tekrarlanan üç basamağa dayanır. Bunlar, denatürasyon, primer bağlanma ve zincir uzama basamaklarıdır. Bu işlemler çok kez tekrarlanarak (30-35 döngü) istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (Birben, 2006).

A: Denatürasyon: Bu basamak, PCR reaksiyonu için kalıp görevi görecek, çift zincirli DNA'nın 94-95°C'ye ısıtılması ile gerçekleşir. Bu sıcaklıkta, bazlar arası hidrojen bağları kırıldığı için kalıp DNA'nın her iki sarmalı birbirinden ayrılır ve böylece primerlerin iki sarmalın arasına girebilmeleri sağlanır. Bu işlem kalıp DNA'nın özelliklerine göre 3-5 dk arasında değişir (Birben, 2006).

B: Primerlerin bağlanması: Primerler, kalıp DNA'da özgül dizilere komplementer olarak dizayn edilmiş oligonükleotidlerdir ve T_m derecelerine yakın bir sıcaklıkta kalıp DNA'ya bağlanabilirler. Bu sıcaklık kullanılan oligonükleotid primerin uzunluğuna ve GC/AT içeriğine göre değişmektedir. Primerler, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak ($5' \rightarrow 3'$) kalıp DNA'ya bağlanırlar (Birben, 2006).

C: Zincir uzaması: Taq polimeraz enzimi yüksek sıcaklıkta polimerizasyonu gerçekleştirilebilen özel bir DNA polimeraz enzimidir. $70-75^\circ\text{C}$ 'de sentez işlemi yaparak kalıp DNA'ya bağlanmış olan primerleri uzatırlar. Yeni oluşan sarmalın her iki zinciri de daha sonraki reaksiyonlar için yine kalıp olarak kullanılır (Birben, 2006).



Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik olarak gösterimi (Birben, 2006).

LMP2 ve LMP7 genlerinde incelenecek polimorfizmleri kapsayan bölgelerin amplifikasyonu için tasarlanan özgül primer dizileri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. LMP2 ve LMP7 genlerinin PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri (Sugimoto vd., 2002).

GEN	PRİMER DİZİLERİ	PCR ÜRÜNÜ BÜYÜKLÜĞÜ
LMP2	İP 5'-CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG-3' GP 5'-CAGCTGAACCAGAGAGTGCATAGT-3'	228 bç
LMP7	İP 5'-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3' GP 5'-TCTCCGGGACTGAAGGCTA-3'	304 bç

LMP2 ve LMP7 genlerinin PCR ile amplifikasyonu için 1 µg genomik DNA örneği, 1 µmol/l ileri primer (İP) ve geri primer (GP), 200 µM her bir dNTP, 1XTaq DNA polimeraz tampon çözeltisi, 1.5 mmol/l MgCl₂ ve 0.5 ünite Taq DNA polimeraz içeren toplam 25 µl karışım hazırlanmıştır.

PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri ise Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. PCR Reaksiyonundaki Isı Döngüleri

	İŞLEM	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
Basamak 1	Ön denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Basamak 2	Denatürasyon	95 °C	0: 30	35
	Primer Bağlanma	53 °C	0: 30	
	Zincir Uzama (Sentez)	72 °C	0: 30	
Basamak 3	Final Sentez	72 °C	5 dk	1

LMP2 ve LMP7 gen bölgeleri Takara PCR Thermal Cycler (Gradient PCR) kullanılarak çoğaltılmıştır.

3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmış ve etidyum bromür kullanılarak görüntülenmesi sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi için gerekli olan TBE solüsyonunun içeriği aşağıdaki gibidir:

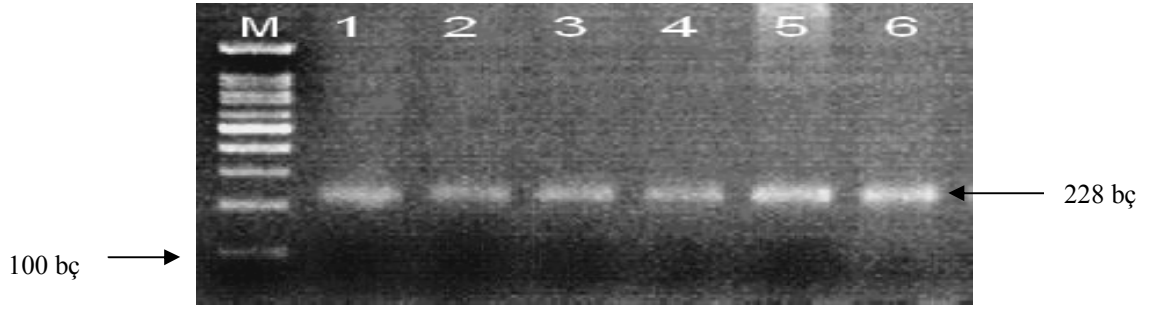
TBE TAMPON ÇÖZELTİSİ (pH: 8,3)

Tris	121,1 g
Borik Asit	61,8 g
EDTA	7,44 g

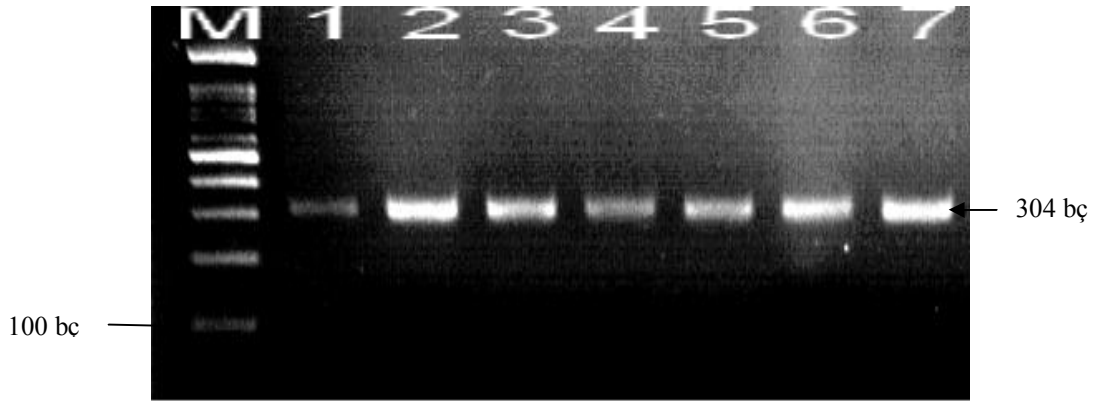
Distile su ile çözümlenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

% 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

- 2 g agaroz hassas terazide tartılıp bir erlene döküldü.
- Üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ilave edildi ve mikrodalga fırın kullanılarak agaroz solusyonu kaynatıldı.
- Erlen 50-55°C'ye soğutulduktan sonra, içerisine 10 µl etidyum bromür (5mg/ml) eklendi.
- Karışım hava kabarcığı olmayacak şekilde jel tabağına döküldü ve oda sıcaklığında yaklaşık 40 dk jelin polimerize olması için bekletildi.
- Jel tabağı, jel tamamen tamponun içerisinde olacak şekilde tankın içerisine yerleştirildi.
- Birinci kuyucuğa DNA belirleyici, ikinci kuyucuğa negatif kontrol (DNA içermeyen PCR ürünü) daha sonraki kuyucuklara ise sırasıyla çalışılan bireylere ait DNA'lar yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi.
- Örnekler 120 V'da yaklaşık 35 dakika yürütüldü. (Cleaver MP- 250 V elektroforez)
- Ardından jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışığında bantların görüntülenmesi sağlandı.(Vilber Lourmat görüntüleme cihazı)



Şekil 3.2. LMP2 geninin PCR ile amplifikasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi; M: 100 bç DNA belirleyici (marker); 1-6: LMP2 geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen 228 bç'lik DNA parçası



Şekil 3.3. LMP7 geninin PCR ile amplifikasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi; M: 100 bç DNA belirleyici (marker); 1-6: LMP7 geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen 304 bç'lik DNA parçası

3.5. LMP2 ve LMP7 Gen Polimorfizmlerinin RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği ile Analizi

“Restriction fragment length polymorphism” (RFLP) analizi tip II restriksiyon endonükleazların çift iplikli DNA’yı özgül tanıma bölgelerinden kesmesi temeline dayanmaktadır (Yıldırım vd., 2007). Endonükleazlar bakteriler tarafından bakteriyofaj infeksiyonuna karşı savunma amacıyla üretilirler. (Yıldırım vd., 2007). Bu enzimler bakteriyofaj DNA’sını tanıyıp parçalarken bakterinin kendi DNA’sına zarar vermezler (Yıldırım vd., 2007). Her bir restriksiyon endonükleaz özgül ve genellikle palindromik olan kısa DNA dizisini (4-8 bç) tanır ve keser (Yıldırım vd., 2007).

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin analizi için PCR ile çoğaltılan gen bölgeleri özgül restriksiyon enzimi ile üretici firmanın önerdiği koşullarda kesime tabi tutulur. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrıştırılırlar.

LMP2 ve LMP7 genlerinin PCR ürünleri (5µl) toplam 10 µl hacim içerisinde 10 U enzim kullanılarak kesilmiş ve 37°C’de 4 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

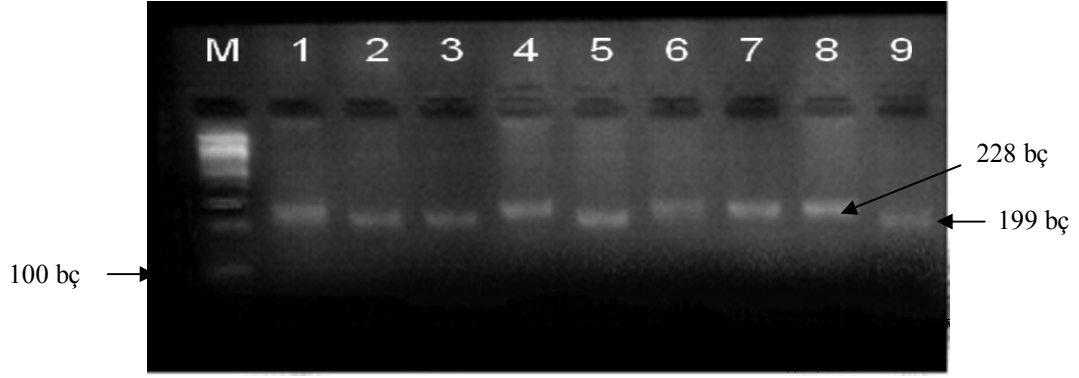
Kesilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmış ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir. Oluşan bantların büyüklükleri standart DNA belirleyicileri (marker) ile karşılaştırılarak tespit edilmiş ve bu şekilde polimorfizmler analiz edilebilmiştir.

Polimorfizmlerin incelenmesi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

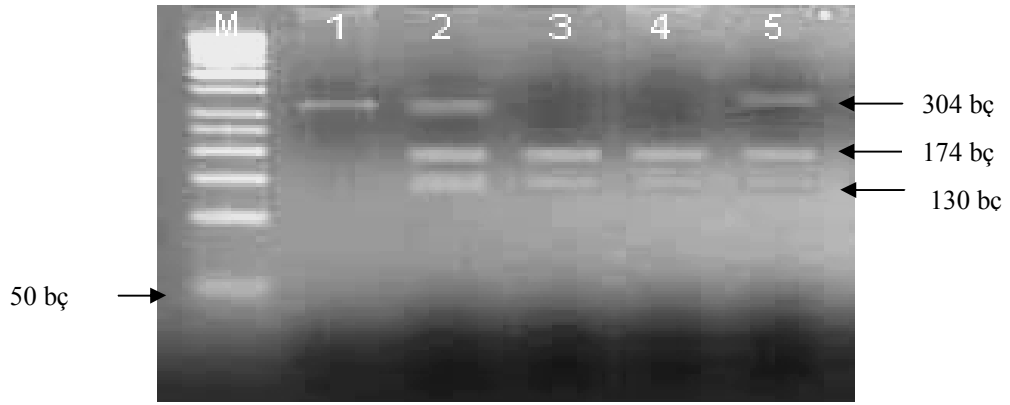
Tablo 3.3. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri (Sugimoto vd., 2002).

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Kesim Ürünleri
LMP2 60 (CGC→TGC) Arjinin (R) → Histidin (H)	Hha I	199 ve 29 bç – R
LMP7 145 (CAG →AAG) Glutamin (Q) → Lizin (K)	Bsm I	174 ve 130 bç – Q

Kesim ürünlerinin analizi için %3’lük agaroz jel hazırlandı. Birinci kuyucuğa DNA belirleyici, ikinci kuyucuğa kesilmemiş DNA ürünü ve diğer kuyucuklara ise kesilmiş PCR ürünleri sırasıyla yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Örnekler, 90 V’da yaklaşık 1 saat yürütüldü. Kesim ürünlerinin büyüklükleri DNA belirleyicilerle karşılaştırılarak tespit edildi.



Şekil 3.4. LMP2 gen polimorfizminin Hha I enzim kesimiyle analizi; M: 100 bç'lik DNA belirleyici; 1: Kesilmemiş PCR ürünü (228 bç); 2,3,5,9: R/R (199 bç); 4,6,7,8: H/H (228 bç)



Şekil 3.5. LMP7 gen polimorfizminin Bsm I enzim kesimiyle analizi; M: 50 bç'lik DNA belirleyici; 1: Kesilmemiş PCR ürünü (304 bç); 3,4: Q/Q (174 bç, 130 bç); 2,5: Q/K (304 bç, 174 bç, 130 bç)

3.6. Genotip Tayini

LMP2 gen bölgesine ait PCR ürünü 228 bç uzunluğundadır. Kesim işlemi sonucunda 228 bç'lik tek bir bant gözleendiğinde (her iki allel kesilmemiş ise) genotip (H/H), 199 ve 29 bç'lik, iki bant gözleendiğinde (her iki allel kesilmiş ise) genotip (R/R), 228, 199 ve 29 bç'lik üç bant gözleendiğinde ise genotip (R/H) olarak değerlendirildi. (Tablo 3.4)

LMP7 genine ait PCR ürünü ise 304 bç uzunluğundadır. Kesim işlemi gerçekleşirse 174 ve 130 bç'lik iki bant oluşur. Kesim işlemi sonucunda, eğer 304 bç'lik tek bir bant gözleniyorsa (her iki allel kesilmemiş ise) genotip (K/K), 174 ve 130 bç'lik iki

bant gözleniyorsa (her iki allel kesilmiş ise) genotip (Q/Q), 304, 174 ve 130 bç'lik üç bant gözleniyorsa genotip (Q/K) olarak değerlendirildi. (Tablo 3.5)

Tablo 3.4. Kesim sonuçlarına göre LMP2 genotiplendirme

LMP2 (GENOTİPLER)	BANT BÜYÜKLÜKLERİ
R/R	199 bç 29 bç
R/H	228 bç 199 bç 29 bç
H/H	228 bç

Tablo 3.5. Kesim sonuçlarına göre LMP7 genotiplendirme

LMP7 (GENOTİPLER)	BANT BÜYÜKLÜKLERİ
Q/Q	174 bç 130 bç
Q/K	304 bç 174 bç 130 bç
K/K	304 bç

3.7. İstatiksel Analiz

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin RFLP ile incelenmesi sonucunda allel ve genotip frekansları direk sayım yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak "SPSS 13,0 for Windows" programı ile Hardy-Weinberg dengesine uyum incelenmiş ve istatiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin allel frekansları kullanılarak Dispan programı (Nei, 1973), (Nei vd., 1983) ile standart genetik uzaklıklar (Nei, 1972) hesaplanmıştır. Ayrıca, standart genetik uzaklıklara dayanarak “Neighbour-Joining” metodu ile bir filogenetik ağaç çizilmiştir (Saitou ve Nei, 1987).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızda, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden, birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 sağlıklı bireyden kan örneği alınarak LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Örneklerin, LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri için genotip dağılımları Tablo 4.1 da verilmiştir.

LMP2 gen polimorfizmi için genotip frekansları, R/R için % 40, R/H için % 29 ve H/H için % 31 olarak hesaplanmıştır. Allel frekansları ise, R alleli için 0,545, H alleli için 0,455 bulunmuştur (Tablo 4.2)

LMP7 gen polimorfizmi için genotip frekansları, Q/Q için % 80, Q/K için % 12 ve K/K için % 0 olarak belirlenmiştir. Allel frekansları ise Q alleli için 0,94, K alleli için 0,06 olarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.3)

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri açısından populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edilmiştir. Allel frekansları dikkate alınarak SPSS 13,0 for Windows programı yardımıyla, her iki gen polimorfizmi için χ^2 ve p değerleri hesaplanmıştır. LMP2 geni için χ^2 değeri 13,87, p değeri ise 0,0008'dir. (Tablo 4.4) Bu sonuca göre, p değeri anlamlıdır ve populasyon Hardy-Weinberg dengesinden sapma göstermektedir. LMP7 geni için ise χ^2 değeri 0,46, p değeri ise 0,79 bulunmuştur.(Tablo 4.4) Bu sonuca göre ise, p değeri anlamlı değildir ve populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir.

Tablo 4.1. LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri için genotip dağılımları

DNA NO.	LMP2	LMP7	DNA NO.	LMP2	LMP7
1	R/R	Q/Q	26	R/H	Q/Q
2	R/R	Q/Q	27	H/H	Q/Q
3	R/H	Q/Q	28	R/R	Q/K
4	R/H	Q/Q	29	R/R	Q/K
5	R/H	Q/Q	30	R/R	Q/K
6	R/H	Q/Q	31	R/R	Q/Q
7	R/H	Q/Q	32	R/R	Q/Q
8	H/H	Q/Q	33	R/H	Q/Q
9	R/H	Q/Q	34	R/R	Q/Q
10	R/R	Q/Q	35	R/H	Q/Q
11	R/H	Q/Q	36	R/R	Q/Q
12	H/H	Q/Q	37	H/H	Q/Q
13	H/H	Q/Q	38	R/H	Q/Q
14	R/H	Q/Q	39	R/H	Q/K
15	H/H	Q/Q	40	R/R	Q/Q
16	R/H	Q/Q	41	R/R	Q/Q
17	R/R	Q/Q	42	H/H	Q/Q
18	R/H	Q/Q	43	R/R	Q/K
19	R/R	Q/Q	44	R/R	Q/K
20	H/H	Q/Q	45	H/H	Q/K
21	R/R	Q/Q	46	H/H	Q/Q
22	H/H	Q/Q	47	H/H	Q/Q
23	H/H	Q/Q	48	R/R	Q/K
24	H/H	Q/K	49	R/R	Q/Q
25	R/H	Q/Q	50	R/R	Q/K

Tablo 4.1. (devam)

DNA NO.	LMP2	LMP7	DNA NO.	LMP2	LMP7
51	R/R	Q/K	76	R/R	Q/Q
52	R/H	Q/Q	77	R/H	Q/Q
53	R/R	Q/Q	78	R/R	Q/Q
54	R/R	Q/K	79	R/R	Q/Q
55	R/H	Q/Q	80	R/R	Q/K
56	R/H	Q/Q	81	R/R	Q/Q
57	R/R	Q/Q	82	H/H	Q/Q
58	R/R	Q/K	83	H/H	Q/Q
59	H/H	Q/Q	84	R/H	Q/Q
60	R/H	Q/K	85	R/R	Q/Q
61	R/H	Q/Q	86	R/R	Q/Q
62	R/H	Q/Q	87	H/H	Q/Q
63	R/R	Q/Q	88	R/R	Q/Q
64	R/H	Q/Q	89	H/H	Q/Q
65	H/H	Q/Q	90	H/H	Q/Q
66	R/H	Q/Q	91	H/H	Q/Q
67	R/R	Q/Q	92	H/H	Q/Q
68	R/H	Q/Q	93	H/H	Q/Q
69	R/R	Q/K	94	R/R	Q/Q
70	R/H	Q/Q	95	H/H	Q/Q
71	R/R	Q/Q	96	H/H	Q/Q
72	R/H	Q/Q	97	H/H	Q/Q
73	R/R	Q/Q	98	H/H	Q/Q
74	R/R	Q/Q	99	H/H	Q/Q
75	H/H	Q/Q	100	H/H	Q/Q

Tablo 4.2. LMP2 gen polimorfizmi için genotip ve allel frekansları

LMP2 (n=100)	Genotip Frekansı
R/R	40 (% 40)
R/H	29 (% 29)
H/H	31 (% 31)
Alleller	Allel Frekansları
R	0,545
H	0,455

Tablo 4.3. LMP7 gen polimorfizmi için genotip ve allel frekansları

LMP7 (n=100)	Genotip Frekansı
Q/Q	88 (% 88)
Q/K	12 (% 12)
K/K	0
Alleller	Allel Frekansları
Q	0,94
K	0,06

Güneydoğu Anadolu Bölgesi popülasyonunda, LMP2 ve LMP7 genlerinin genotip ve allel frekansları, χ^2 ve p değerleri hesaplanmış ve LMP2 ve LMP7 genleri için diğer popülasyonlarda yapılmış olan çalışmalarla bu çalışmanın sonuçları Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4. LMP2 ve LMP7 genleri genotip ve allel frekansları ve χ^2 ve P değerleri

LMP Polimorfizm	n=100	%	χ^2	P
LMP2-60				
Genotipler				
R/R	40	% 40	13,87*	0,0008
R/H	29	% 29		
H/H	31	% 31		
Alleller	Allel Frekansları			
R	0,545			
H	0,455			
LMP7-145				
Genotipler				
Q/Q	88	% 88	0,46	0,79
Q/K	12	% 12		
K/K	0	0		
Alleller	Allel Frekansları			
Q	0,94			
K	0,06			

*p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı populasyonlarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin allel frekansları

POPULASYONLAR	n	LMP2-H	LMP2-R	n	LMP7-Q	LMP7-K	KAYNAK
Mestizo (Meksika)	190	0,269	0,731	190	0,894	0,106	Alarcon vd,2002
Nahua (Meksika)	96	0,344	0,656	96	0,916	0,084	Alarcon vd,2002
Mazatec (Meksika)	112	0,232	0,767	52	0,942	0,058	Alarcon vd,2002
Teenek (Meksika)	100	0,280	0,720	100	0,910	0,090	Alarcon vd,2002
Mayo (Meksika)	126	0,349	0,651	126	0,873	0,127	Alarcon vd,2002
Guarani (Brezilya)	184	0,011	0,989	186	0,892	0,108	Rueda-Faucz vd,2000
Kaingang (Brezilya)	478	0,195	0,805	482	0,485	0,515	Rueda-Faucz vd,2000
Beyaz Irk (ABD)	372	0,260	0,740	372	0,444	0,556	Deng vd,1995
Asya (Japonya)	106	0,250	0,750	180	0,612	0,388	Kawaguchi vd,1994
Beyaz ırk (İspanya)	204	0,216	0,784	204	0,883	0,117	Vinasco vd,1998
Güneydoğu Anadolu (Türkiye)	200	0,455	0,545	200	0,940	0,060	Tez Çalışması

n: Analiz edilen toplam allel sayısı

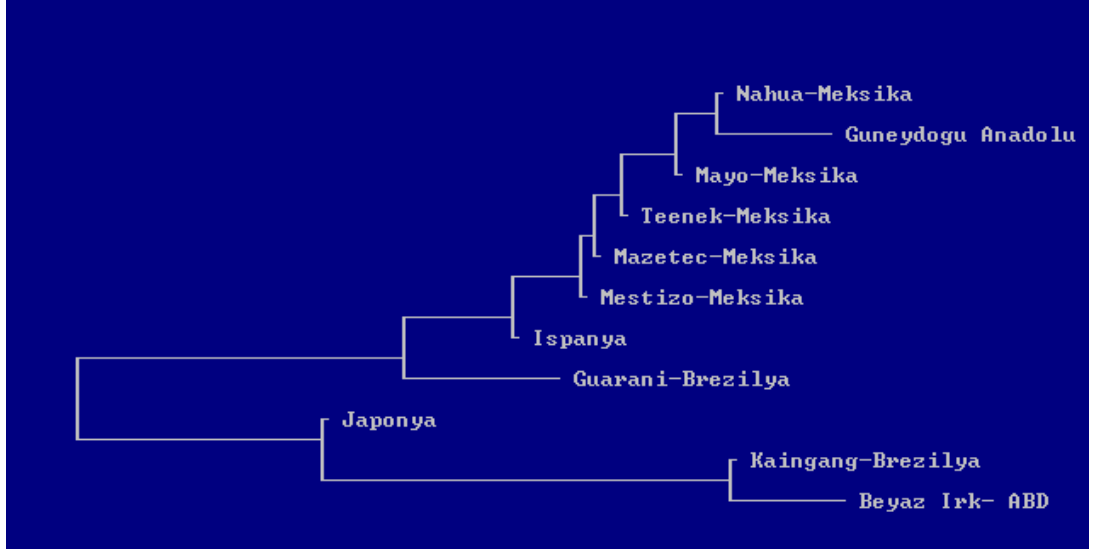
Tablo 4.5.'te görüldüğü gibi en düşük LMP2-H allel frekansı Guarani (Brezilya) popülasyonuna, en yüksek allel frekansı ise Güneydoğu Anadolu (Türkiye) popülasyonuna aittir. Dolayısıyla da en düşük LMP2-R allel frekansı çalıştığımız popülasyonda gözlenirken en yüksek frekans Guarani popülasyonuna aittir.

LMP7-Q allelinin en az gözleendiği popülasyon Amerika (Beyaz ırk) ve en çok gözleendiği popülasyon ise Meksika (Mazatec) popülasyonudur.

Tablo 4.6'da daha önce çalışılmış farklı popülasyonlara ait LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin allel frekansları ve bu veriler kullanılarak hesaplanan popülasyonlar arası standart genetik uzaklıklar verilmiştir.

Tablo 4.6. Populasyonlar arası standart genetik uzaklıklar

POPULASYONLAR	Mestizo	Nahua	Mazetec	Teenek	Mayo	Guarani	Kaingang	Beyaz ırk (ABD)	Japonya	İspanya
Nahua	0,0009									
Mazetec	-0,0011	0,0038								
Teenek	-0,0028	-0,0015	-0,0021							
Mayo	0,0013	-0,0033	0,0064	-0,0004						
Guarani	0,0344	0,0625	0,0266	0,0379	0,0631					
Kaingang	0,1366	0,1694	0,1573	0,1476	0,1452	0,1224				
Beyaz ırk (ABD)	0,1649	0,1924	0,1926	0,1762	0,1643	0,1712	0,0030			
Japonya	0,0550	0,0733	0,0702	0,0612	0,1643	0,0698	0,0130	0,0214		
İspanya	-0,0001	0,0089	-0,0005	0,0004	0,0088	0,0198	0,1213	0,1534	0,0485	
Güneydoğu Anadolu	0,0243	0,0059	0,0304	0,0194	0,0082	0,1250	0,2346	0,2483	0,1169	0,0411



Şekil 4.1. Güneydoğu Anadolu popülasyonu ve diğer popülasyonlar arasındaki genetik uzaklıkları gösteren “Neighbour-Joining” dendogramı (Saitou ve Nei, 1987).

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizleri dikkate alınarak popülasyonların ortalama heterozigotluk değerleri hesaplanmış ve Tablo 4.7.’de verilmiştir. Buna göre, heterozigosite değeri en yüksek popülasyon $\sim 0,44$ ile Beyaz ırk-ABD popülasyonudur ve ikinci sırada $\sim 0,43$ ile Japonya popülasyonu gelmektedir. En düşük heterozigosite değerleri $\sim 0,10$ ile Guarani ve $0,23$ ile Mazatec popülasyonlarına aittir. Güneydoğu Anadolu popülasyonu $\sim 0,30$ heterozigotluk değeri ile arada yer almaktadır.

Tablo 4.7. LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri açısından populasyonların averaj heterozigotluk değerleri

Populasyon	Averaj heterozigosite	Standart sapma
Mestizo-Meksika	0,292945	0,102414
Nahua-Meksika	0,305793	0,150285
Mazetec-Meksika	0,236263	0,124848
Teenek-Meksika	0,286364	0,120909
Mayo-Meksika	0,340775	0,117259
Guarani-Brezilya	0,107795	0,085918
Kaingang-Brezilya	0,407598	0,092990
Beyaz ırk-ABD	0,440448	0,054611
Asya-Japonya	0,428068	0,049497
Beyaz ırk-İspanya	0,273998	0,066358
Güneydoğu Anadolu	0,305905	0,192538
LMP2 ve LMP7 gen bölgeleri		
Gst 0,123264		
Ht 0,353001		
Hs 0,309489		

Gst, Ht, Hs populasyonlar arası farklılaşma derecesini ifade eden değerlerdir. $Gst = Ht - Hs / Ht$ olarak hesaplanabilir. Ht; popülasyondaki heterozigot bireylerin tüm bireylere oranını ve Hs; alt popülasyonlardaki averaj ölçülmüş heterozigositeyi ifade eder.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetik polimorfizmler, populasyonlar arası evrimsel ilişkinin belirlenmesi için son derece önemli araçlardır. İnsan genomunun gen açısından en yoğun bölgelerinden birisi olan MHC bölgesindeki genlerde önemli ölçüde polimorfizm saptanmıştır (Shiina vd., 2004). HLA molekülleri hücre yüzeyinde yer alan glikoprotein yapısında moleküllerdir ve tiplerine göre farklı hücrelerde bulunabilirler (Beksaç, 2004). En önemli görevleri ise hücre içi veya hücre dışı kaynaklı peptidleri bağlayarak bunların hücreden uzaklaştırılması ve aynı zamanda da bağışıklık yanıtın düzenlenmesidir. (Beksaç, 2004).

MHC sınıf II bölgesinde yer alan ve proteozom sisteminin bileşenlerini kodlayan LMP genleri antijen sunumundaki önemli rollerinden dolayı özellikle otoimmün hastalıklara yatkınlık için aday gen olma özelliğindedirler. Literatürde LMP genleri ve çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkinin varlığını ortaya koyan çok sayıda çalışma olmasına rağmen bazı çalışmalarda bu ilişki tespit edilememiş veya gözlenen ilişkinin temel nedeninin hastalıkla doğrudan doğruya ilişkili HLA genleriyle olan bağlantı eşitsizliğinin ikincil etkisi olduğu bildirilmiştir (Kobayashi vd., 1998). Etnik gruplara yönelik hastalık ilişkilendirme çalışmaları bağlantı eşitsizliğinin karıştırıcı etkisini ortadan kaldıracak ve esas hastalık ilişkili allellerin belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Bu nedenle populasyon genetiği çalışmaları LMP genlerinin genetik ve evrimsel belirleyici olarak olası görevlerini anlamaya önemli katkıda bulunmaktadır. Ancak LMP genlerine yönelik populasyon genetiği çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Bir çalışmada, (Vargas-Alarcon vd., 2002), farklı linguistik kökene sahip Meksika melez populasyonu (Mestizo) ve Meksika kıızıldereli yerli populasyonlarında (Nahua, Mazatec, Teenek ve Mayo) LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri incelenmiş, başka bir çalışma ise Brezilya kıızıldereli populasyonlarına (Guarani ve Kaingang) yönelik gerçekleştirilmiştir (Faucz vd., 2000). Çalışmamız sonucunda Güneydoğu Anadolu populasyonu için elde ettiğimiz

veriler literatürdeki diğer popülasyonlara ait bilgilerle birleştirilerek popülasyonun diğer popülasyonlarla genetik uzaklığını anlamaya yönelik kapsamlı analizler yapılmaya çalışılmıştır. Analizler sonucunda, LMP2-H allel frekansının Brezilya kızılderelilerinde (Guarani popülasyonunda) en düşük olmasına karşın Güneydoğu Anadolu popülasyonunda en yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, en yüksek LMP7-Q allel frekansı Meksika Mazatec popülasyonuna aitken, en düşük allel frekansının Beyaz ırk-ABD popülasyonuna ait olduğu gözlenmiştir. Ancak, yapılan çalışmada (Vargas-Alarcon vd., 2002), Mazatec popülasyonundan sadece 26 bireyin (toplam 52 allel) yer aldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

LMP2 ve LMP7 allel ve genotip dağılımları birlikte dikkate alındığında Nahua ve Mayo popülasyonları dışındaki Meksika popülasyonlarının birbirine daha çok benzerlik gösterdiği dikkat çekmiştir. Ayrıca bu iki popülasyonun LMP2-H allel frekansı açısından en yüksek frekansa sahip Güneydoğu Anadolu popülasyonuna en yakın olduğu dikkate değer bir bulgudur.

LMP7-Q allel frekansı incelendiğinde ise; Güneydoğu Anadolu popülasyonuna en yakın değerlere sahip popülasyonların Meksika (Mazatec, Nahua, Teenek) popülasyonları olduğu görülmektedir. Meksika popülasyonlarında yapılan çalışmada K/K genotipinin bu popülasyonlarda gözlenmemiş olduğu bildirilmiştir (sadece tek bir Mazatec bireyinde bu genotip tanımlanmıştır). Karşılaştırmaya alınan tüm popülasyonlarda en düşük LMP7 –K allel frekanslarının Meksika yerli popülasyonlarında tespit edilmiş olması bu yüzdendir. Yerli Amerikan popülasyonlarında K alleli frekansının düşük bulunması, bu polimorfizmin 25.000 yıl önce kuzey kutbuna yerleşerek Amerika'ya yayılan kuzey Asya popülasyonlarında var olmadığı ve daha sonra genetik karışım yoluyla kazanıldığı düşüncesini yaratmıştır (Cavalli-Sforza vd., 1994). Güneydoğu Anadolu popülasyonunda da K/K genotipinin hiç tespit edilememiş olması ise ilginç bir bulgudur.

Popülasyonlar arası genetik uzaklıklar hesaplandığında ve “Neighbour-Joining” dendogramı çizildiğinde dikkati çeken nokta ise; Meksika (Nahua, Mazatec, Teenek, Nahua, Mayo) popülasyonlarının kendi içlerinde yakınlık göstermesidir. Ayrıca, dendogram incelendiğinde Güneydoğu Anadolu popülasyonuna en yakın popülasyonun Nahua en uzak popülasyonların ise Beyaz ırk-ABD ve Kaingang-Brezilya popülasyonu olduğu açıkça gözlenebilir. Meksika popülasyonları ve

Güneydoğu Anadolu populasyonu coğrafik olarak birbirinden çok uzak olmasına rağmen aradaki benzerlik dikkat çekicidir. Bu iki populasyon arasındaki benzerliği açıklayacak tarihsel bir ilişki net olarak bilinmemekle birlikte, polimorfizmlerin genetik karışım yoluyla populasyonların gen havuzlarına giriş zamanlarının yakın olabileceği düşünülmektedir.

Brezilya kıızıldereli populasyonları (Guarani ve Kaingang) arasında ise önemli ölçüde bir genetik uzaklık göze çarpmaktadır. Literatürde yer alan diğer polimorfizm çalışmaları da dikkate alındığında bu iki populasyonun Güney Amerika yerli populasyonları arasında birbirine en uzak iki populasyon olduğu tespit edilmiştir (Arnaiz-Villena vd., 2000). Founder etki ve rasgele genetik sapmanın sonucunda bu populasyonların böyle bir ayrıma uğradığı düşünülmektedir. Bu iki grup Brezilya'ya farklı yerlerden göç ettikleri için gen havuzlarının farklı olması doğaldır (Faucz vd., 2000).

Yine dendogram incelendiği zaman İspanya-beyaz ırk populasyonunun Meksika populasyonlarına en yakın populasyon olduğu, öte yandan Asya - Japonya populasyonunun ise Kaingang (Brezilya) yerlileri ve ABD-beyaz ırk populasyonu ile birlikte bu gruptan ayrıldığı göze çarpmaktadır.

Güneydoğu Anadolu populasyonu için heterozigotluk değeri 0,30 olarak hesaplanmış ve diğer populasyonların heterozigotluk değerleri ile karşılaştırıldığında ortalama bir değer olduğu gözlenmiştir. Heterozigotluk değerinin yüksek olması genetik çeşitliliğin çokluğunun bir göstergesidir. Anadolu'nun farklı dönemlerde farklı uygarlıklara ev sahipliği yaptığı dikkate alınır ise heterozigositenin yüksek olması beklenmelidir. Tüm bölgeler dikkate alındığında hesaplanan H_t ve H_s değerleri, populasyonların genel olarak Hardy-Weinberg dengesine uyum gösterdiğine işaret etmektedir. Zira, hesaplanan H_t değeri H_s değerinden daha büyüktür.

Antijen sunumundaki önemli rolleri bilinmekle birlikte LMP gen polimorfizmlerinin hastalığa yatkınlıkta ne tür bir etkiye sahip olduğu henüz çok net belirlenememiştir. Alzheimer hastalarının beyin dokuları (serebellum ve hipokampus) kullanılarak yapılan bir çalışmada, Alzheimer hastalarında ve yaşlı bireylerde proteozom miktarı ve aktivitesinin değişkenlik gösterdiği ve LMP2 kodon 60 polimorfizminin proteozom aktivitesine etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Mishto vd., 2004).

Genetik polimorfizmler, coğrafik bölgelere veya etnik gruplara göre farklılık gösterebilmektedir. Farklı popülasyonlardaki allel ve haplotip dağılımları, allel ürünleri arasındaki etkileşimde yapısal ve fonksiyonel kısıtlamalar nedeniyle TAP-LMP bölgesindeki genlerin birlikte evrimleşmedikleri görüşünü destekleyecek niteliktedir (Faucz vd., 2000). Yapılan bir çalışmada SNP belirleyiciler, klasik HLA bölgeleri, TAP genleri, kısa ardışık tekrarlar (mikrosatellit) genotiplendirilerek MHC bölgesinin haplotip haritası çıkarılmıştır (Walsh vd., 2003). Bu çalışmanın sonucunda klasik HLA bölgeleri dışında kalan MHC bölgesinin bağlantı eşitsizliği ve varyasyon açısından genomun diğer bölgelerinden farklı olmadığı ve bu bölgedeki genler arasında bağlantı olmadığı bildirilmiştir (Walsh vd., 2003). Ayrıca popülasyonlardaki allel frekansları incelendiğinde, bu genlerde önemli derecede seleksiyon etkisi olmadığı ve genotip dağılımlarının genellikle Hardy-Weinberg prensiplerine uygun şekilde olduğu gözle çarpılmaktadır.

TAP1 ve TAP2 gen polimorfizmleri Anadolu popülasyonunda daha önce yapılan bir çalışmada incelenmiş ve genotip dağılımları belirlenmiş, (Gerçekker ve Özgüç, 2002) ancak LMP2 ve LMP7 genleri ile ilgili bir çalışma henüz yapılmamıştır. Çalışmamız bu anlamda ilk olma özelliği taşımaktadır ancak yaptığımız çalışmada örnekleme tüm Anadolu popülasyonunu kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiş olması çalışmanın bir eksikliğidir. Yeterli sayıda örnekleme yapılamadığı için çalışma Güneydoğu Anadolu popülasyonu ile sınırlandırılmak zorunda kalmıştır, ancak genel Anadolu popülasyonunu temsil edecek şekilde örnek sayısının artırılmasına yönelik örnekleme çalışmaları devam etmektedir. Örnek sayısının artırılmasıyla örneklemeyle ilgili hataların en aza indirileceği ve böylelikle daha güvenilir sonuçlar elde edileceği açıktır.

Ülkemizin coğrafik konumu göz önüne alınarak, zamanla komşu ülkelerin popülasyonlarına yönelik çalışmaların yapılması ve sonuçların yayınlanmasıyla bu popülasyonlardaki allel frekansları da dikkate alınabilecek ve böylece genetik uzaklık çalışmaları daha anlamlı hale gelecektir. Ayrıca bu çalışmalar, LMP2 ve LMP7 genleri dışındaki MHC genlerini de kapsayacak şekilde planlanırsa haplotip analizleri yapılabilecek ve çok daha verimli sonuçlar elde edilebilecektir. Bu çalışmalar, aynı zamanda popülasyonlarda yapılan hastalık ilişkilendirme çalışmaları açısından da oldukça önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarco'n G, Granados J *et al.*(2000). HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*, **56**, 405–416
- Beksac M, (2004). HLA ve Doku Tiplendirilmesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı. 42-49
- Bilbao JR, Martin-Pagola A, Vitoria JC, Zubillaga P, Ortiz L, Castano L. (2002). Hla-Drb1 and mhc class I chain-related a haplotypes in basque families with celiac disease. *Tissue Antigens*, **601**, 71-6
- Birben E. (2006). Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji*, **4**, 92-94
- Bixby DL, Yannelli JR. (1998). CD80 expression in an HLA-A2-positive human non-small cell lung cancer cell line enhances tumor-specific cytotoxicity of HLA-A2-positive T cells derived from a normal donor and a patient with non-small cell Lung Cancer. *International Journal of Cancer*, **78**, 685-94
- Cai M, Yan L, Cheng H, Ding H, Fu Z. (2002). Antigen transporter gene polymorphism and predisposition to graves disease: a preliminary analysis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **41**, 758-61
- Cao B., Tian X., Li Y., Jiang P., Ning T., Xing H., Zhao Y., Zhang C., Shi X., Chen D., Shen Y., Ke Y. (2005). LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in Esophageal Carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis*, **26**, 1280-1284
- Casp CB, She JX, McCormack WT. (2003). Genes of the LMP/TAP Cluster are Associated with the Human Autoimmune Disease Vitiligo. *Genes&Immunity*, **4**, 492-9

- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. (1994). *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press: Princeton, NL, pp 321–325.
- Changqing X., Suxia Q., Lei G., Hong C., Meiqiang L., Hongli Y., Kun L., Bangwei C. (2007). Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and Hepatitis B Virus infection risk in the Chinese population. *Journal of Clinical Immunology*, **27**,534-41
- Chevrier D., Giral M., Perrichot R., Latinne D., Coville P., Muller J., P.Soulillou J., Bingon J.D.(1997). Idiopathic and secondary membranous nephropathy and polymorphism at TAPI and HLA-DMA loci. *Tissue Antigens*, **50**, 164-169
- Correa PA, Molina JF, Pinto LF, Arcos-Burgos M, Herrera M, Anaya JM. (2003). TAP1 and TAP2 polymorphisms analysis in Northwestern Colombian Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **62**, 363-5
- Çarin, M.N.(2004). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Anabilim Dalı V. Çukurova Anestezi Günleri Transplantasyon ve İmmün Yanıt
- Dai Y., Ning T., Li K., Qi S.X., Jiang M.W., Chai Q.B., Gai Y.H., Wang X. (2005). Association between LMP2/LMP7 gene polymorphism and the infection of Hepatitis B Virus. *Beijing Da Xue Xue Bao*, **18**, 508-12
- Dalva K. (2004). Her yerde karşımda: Nedir bu HLA tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu. 42-52
- Dawkins, R., Leelayuwat, C., Gaudieri, S., Tay, G., Hui, J., Cattley, S. et al. (1999). Genomics of the Major Histocompatibility Complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunological Reviews*., **167**, 275–304
- de Jong MM, Nolte IM, de Vries EG, Schaapveld M, Kleibeuker JH, Oosterom E, Oosterwijk JC, van der Hout AH, van der Steege G, Bruinenberg M, Boezen HM, Te Meerman GJ, van der Graaf WT.(2003). The HLA class III subregion is responsible for an increased Breast Cancer risk. *Human Molecular Genetics*., **12**, 2311-9

- Deng G., Muir A., Maclaren N and She J. (1995). Association of LMP2 and LMP7 genes within the Major Histocompatibility Complex with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Population and Family Studies. *The American Journal of Human Genetics.*, **56**, 528-534
- Doğru D., Gerçeker F.Ö., Yalçın E., Çobanoğlu N., Pekcan S., Özçelik U., Kiper N., Özgüç M. (2007). The role of TAP1 and TAP2 gene polymorphism in Idiopathic Bronchiectasis in children. *Pediatric Pulmonology*, **42**, 237- 241
- Faucz F.R., Probst C.M. & Petzl-Erler M.L. (2000). Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. *European Journal of Immunogenetics*, **27**, 5–16
- Feng ML., Yin B., Shen T., Huang H., Zheng JW., Qian KC., Liu DZ. (2008). Determination of TAP1 and TAP2 polymorphism in the Chinese Han population by real-time Taq-man polymerase chain reaction. *Tissue Antigens*, **72**, 441-7
- Foley P.J., Lympny P.A., Puscinska E., Zielinski J., Welsh K.I. and Roland Bois R.B. (1999). Analysis of MHC encoded antigen-processing genes TAP1 and TAP2 polymorphisms in Sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **160**, 1009-1014
- Fraile A., Collado M.D., Matarán L., Martín J., Nieto A. (2000). TAP1 and TAP2 polymorphism in spanish patients with Ankylosing Spondylitis. *Experimental and Clinical Immunogenetics.*, **17**, 199-204
- Gerçeker F.Ö., Özçelik U., Kiper N., Anadol D., Göçmen A., Yılmaz E., Yurter H.E., Özgüç M. (2002). Analysis of the modifying effects of TAP1/2 genes on Cystic Fibrosis phenotype. *The Turkish Journal of Pediatrics*, **44**, 91-9
- Gerçeker F.Ö., M. Özgüç. (2002). Frequencies of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in the Anatolian Population. *European Journal of Immunogenetics*, **30**, 97-99

- Gruen JR, Weissman SM. (1997). Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*, **90**, 4252-65
- Gostout B.S., Poland G.A., Calhoun E.S., Sohni Y.R., Giuntoli R.L., McGovern R.M., Sloan J.A., Cha S.S., Persing D.H. (2003). TAP1, TAP2 and HLA-DR2 Alleles are predictors of Cervical Cancer risk. *Gynecologic Oncology*, **88**, 326-32
- Heward J. M., Allahabadi A., Sheppard M. C., Barnett A. H., Franklyn J. A. and S Gough C.L. (1999). Association of the large multifunctional proteasome (LMP2) gene with Graves' disease is a result of linkage disequilibrium with the HLA haplotype DRB1*0304- DQB1*02 DQA1*0501. *Clinical Endocrinology*, **51**, 115–118
- Ikuta Y, Katayama N, Wang L, Okugawa T, Takahashi Y, Schmitt M, Gu X, Watanabe M, Akiyoshi K, Nakamura H, Kuribayashi K, Sunamoto J, Shiku H. (2002). Presentation of a major histocompatibility complex class 1-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex :implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood.*, **99**, 3717-24
- Ishihara M., Ohno S., Mizuki N., Yamagata N., Ishida T., Naruse T., Ando A. and Inoko H. (1999). LMP7 polymorphism in Japanese patients with Sarcoidosis and Behçet's disease. *Human Immunology*, **51**, 103-105
- Kobayashi T, Yokoyama I, Hayashi.(1998). TAP1, TAP2, LMP2 DMA and DMB genetic polymorphisms in renal transplantation. *Transplantation Procedures*; **30**: 29–30.
- Krämer U., Illig T., Grune T., Krutmann J., Esser C. (2007). Strong associations of Psoriasis with antigen processing LMP and transport genes TAP differ by gender and phenotype. *Genes and Immunity*, **8**, 513–517
- Kuzushita N., Hayashi N., Kanto T., Takehara T., Tatsumi T., Katayama K., Ohkawa K., Ito A., Kasahara A., Moribe T., Sasaki Y. and Hori M. (1999). Involvement of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2)

- gene polymorphisms in hepatitis C Virus infection. *Gastroenterology*, **116**, 1149-1154
- Lee H.J., Ha S. J., Han H. and Kim J. W. (2001). Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with Atopic Dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, **31**, 1867-1874
- Mehta A.M., Jordanova E.S., Wezel T., Uh H., Corver W.E., Kwappenberg K.M.C., Verduijn W., Kenter G.G., Burg S.H., Fleuren G.J. (2007). Genetic variation of antigen processing machinery components and association with Cervical Carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **46**, 577-586
- Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. (2004). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*, **27**, 54-66
- Nei, M. (1972). Genetic distances between populations. *The American Naturalist*, **106**, 283
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **70**, 3321
- Nei, M., Tajima, F. & Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**, 153
- Penforis A., Tuomilehto-Wolf E., The DiMe (Childhood Diabetes in Finland) Study Group, Denise L. Faustman, and Graham A. Hitman. (2002). Analysis of TAP2 polymorphisms in Finnish Individuals with Type I Diabetes. *Human Immunology*, **63**, 61-70
- Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Kim TY, Kim TG. (2003). Association of TAP and HLA-DM genes with Psoriasis in Koreans. *Journal of Investigate Dermatology*, **120**, 616-22

- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406
- Shiina, T., Inoko, H. & Kulski, J. K. An update of the HLA genomic region, loci information and disease associations: (2004). *Tissue Antigens* **64**, 631–649
- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics.*, **54**, 15-39
- Sugimoto Y., Kuzushita N., Takehara T., Kanto T., Tatsumi T., Miyagi T., Jinushi M., Ohkawa K., Horimoto M., Kasahara A., Hori M., Sasaki Y., Hayashi N.. (2002). A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, **9**, 377–384
- The MHC sequencing consortium (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, **401**, 921-3
- Vargas-Alarcón G., Gamboa R., Zuniga J., Fragoso J.M., Hernandez-Pacheco G., Londono J., Pacheco Tena C., Cardiel M.H., Granados J., Burgos-Vargas R. (2004). Association study of LMP7 gene polymorphisms in Mexican patients with Spondyloarthritis. *Human Immunology*, **65**, 1437-1442
- Vargas-Alarcón G., Gamboa R., Vergara Y., Rodriguez-Zepeda JM., Pena A., Izaguirre R., Zuñ iga J., Ruiz-Morales J.A. and Granados J. (2002). LMP2 and LMP7 gene polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Amerindians. *Genes and Immunity*, **3**, 373–377
- Vinasco J., Fraile A., Nieto A., Beraun Y., Pareja E., Mataran L., Martín J. (1998). Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **57**, 33–37
- Walsh E.C., Mather K.A., Schaffner S.F., Farwell L., Daly M.J., Patterson N., Cullen M., Carrington M., Bugawan T.L., Erlich H., Campbell J., Barrett J., Miller K., Thomson G., Lander E.S., Rioux J.D. (2003). An Integrated Haplotype

Map of the Human Major Histocompatibility Complex. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 580-590

Weber DA, Dao CT, Jun J, Wigal JL, Jensen PE. (2001). Transmembrane domain-mediated colocalization of HLA-DM and HLA-DR is required for optimal HLA-DM catalytic activity. *The Journal of Immunology*, **167**, 5167-74

Xiaochun Z., Yong Z., Qiaoqiao W., Fuqing W. (2000). Polymorphisms of TAP, LMP and HLA-DM genes in Chinese. *Chinese Medical Journal*, **113**, 372-375

Xu C., Qi S., Gao L., Cu H., Liu M., Yang H., Li K., Cao B. (2007). Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and Hepatitis B Virus infection risk in the Chinese Population. *Journal of Clinical Immunology*, **27**, No.5

Yakut, T. (2004). HLA Doku Uygunluk Kompleksi, Genetik Lokalizasyonları ve Fonksiyonları. *Güncel Pediatri*, **2**, 53-57

Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B. (2007). *Moleküler Biyoloji Protein Sentezi ve Yıkımı*. Nobel Yayınevi

Yılmaz E.(1996). Monoklonal HLA Klas I doku tipi plaklarının babalık tayinlerinde kullanılabilirliğinin araştırılması ve diğer konvansiyonel sistemlerle karşılaştırılması. Fen Bilimleri Doktora Tezi.

Zhang S.L., Chabod J., Penfornis A., Reviron D., Tiberghien P., Wendling D., Toussiro E.(2002a). TAP1 and TAP2 gene polymorphism in Rheumatoid Arthritis in a population in Eastern France. *European Journal of Immunogenetics*, **29**, 241-9

Zhang S., Penfornis A., Harraga S., Chabod J., Beurton I., Bresson-Hadni S., Tiberghien P, Kern P.& Vuitton D.-A. (2002b). Polymorphisms of the TAP1 and TAP2 genes in Human Alveolar Echinococcosis. *European Journal of Immunogenetics*, **30**, 133- 139