

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ KÜTÜPHANESİ

T. C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

## HLA EPİTOP UYGUNLUĞU

UZMANLIK TEZİ

DR. Nurullah AKKOÇ

WH 200

AKK

1991

İZMİR 1991

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

HLA EPİTOP UYGUNLUĞU

UZMANLIK TEZİ

DR. NURULLAH AKKOÇ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
Tez No: 16206/13
Sonuçlama No: WH.200.AKK
Geliş Tarihi: 1991

İZMİR 1991

## ÖNSÖZ

5.5 yıl önce Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinde İç Hastalıkları Ana Bilim Dalında asistanlık görevime başladığımda hastanemizin oldukça mütevazı sayılabilecek olanakları vardı. Ancak bu mütevazı olanakları aşabilmem için asistanlığıma başladığımdan beri saygıdeğer hocalarımdan görmüş olduğum destek ve anlayışa müteşekkirim. Bu destek sayesinde ki fakültemin sağladığı olanaklarla yurt dışına giderek çok istediğim İmmunoloji dalında çalışma fırsatı ve bu tezi hazırlama imkanı buldum. Bu nedenle kendimi hocalarıma, fakülteme ve çok kısıtlı kaynaklarından bir kısmını benim gibi daha birçok araştırmacının yurt dışında yetişmesi için harcayan çok sevgili ülkeme kendimi borçlu hissediyorum. İmmunoloji konusunda yetişmemin yanısıra, labratuarında bağımsızca çalışmama olanak tanıyan, eleştirileriyle beni yönlendiren ve bilimsellik adına bana çok şey öğreten Prof. Dr. Juan Scornik'in adını da burada saygıyla anmadan geçemeyeceğim. Son olarak ta, tüm öğretim hayatım boyunca daima bana destek olan annemi şükranla, yurtdışında bulunduğum sırada vefatına son anda yetişebildiğim sevgili babamı ise hem şükranla hem de rahmetle anıyorum.

Dr. Nurullah AKKOÇ



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Özet	1
Giriş	2
Materyel ve Metod	6
Sonuçlar	10
Tartışma	19
İngilizce Özet	22
Kaynaklar	23

## ÖZET

Günümüzde HLA uygunsuzluğu ile vericide olan fakat alıcıda olmayan HLA antijenlerinin varlığı anlaşılır. Ancak HLA moleküllerinin aminoasit (AA) sekanslarının belirlenmiş olması bu yaklaşımı modifiye etme arayışlarına yol açmıştır. Bu paralelde , HLA uygunsuzluğu olan durumlarda verici ile alıcı arasındaki farklı HLA antijenlerinin sayısı yerine verici ile alıcının HLA antijen moleküllerindeki farklılık gösteren AA substitusyonlarının sayısının dikkate alınması gerektiği ileri sürülmektedir. HLA B62 ile B46 molekülü 66 ve 76. AA'ler arasındaki segment hariç birbirleri ile identiktirler. B62'ye bağlanan fakat B46'ya bağlanmayan bir antikorun epitopu bu bölgede olmalıdır. Bu çalışmada kendi HLA antijenlerinden en az birisinin 66-76. AA segmenti HLA-B62 ile aynı olan sensitize hasta serumları kullanıldı. Serumlar önce Homozigot Tiplendirme Hücreleri (HTH) 9031 (A2,B62) ile absorbe ve elue edildi. Elde edilen eluat daha sonra HTH 9066 (A2,B46) ile absorbe edildi. Bu şekilde elde edilen antikor preparasyonunun B62'ye bağlanıp B46'ya bağlanmadığı flow sitometrede gösterildi. Bu antikorlar daha sonra 20 HTH'lik bir panele karşı flow sitometrede test edilerek , hangi HLA antijenlerine bağlandıkları saptandı. Antikor spesifisitelerinin HLA moleküllerinin AA sekansları ile birlikte analizi gösterdi ki bunlar 66-76. segmentteki AA'lere ilave olarak üç boyutlu yapıda bu segmente yakın olan AA'leri de tanıyorlardı. Sonuç olarak yabancı HLA molekülündeki alıcının kendi HLA moleküllerindeki ile aynı olan AA rezidüleri, başka bölgelerdeki farklı AA rezidüleri ile interaksiyona girerek alloantikor cevabını uyaran epitoplar oluşturabilirler.



## GİRİŞ

İnsan lökositlerine bağlanan alloantikorları ilk olarak 1950'li yıllarda Dausseut saptamış ve Mac olarak adlandırdığı bu antijenin histokompatibiletede rol oynayabileceğini ileri sürmüştür (1). Ardından çeşitli lökosit antijenlerinin oluşturduğu Hu-1 sistemini tarif eden Dausseut daha sonra bu alandaki çalışmaları nedeniyle Nobel ödülünü kazanmıştır. Van Rood ve Van Leeuwen 4a ve 4b adını verdikleri ilk allelik lökosit antijenlerini tarif ederek bugünkü majör histokompatibilite kompleksi (MHC) adını verdiğimiz bu sistemin anlaşılmasına büyük katkıda bulunmuşlardır (2). Bu kişiler bu antijenlerin belirlenmesi için hamile kadınların serumlarının kullanılabilceği fikrini ilk ortaya atan kişiler olmuş ve kompütür analizleri kullanarak bu alandaki bilgilerin çok süratle gelişmesini sağlamışlardır.

İnsanda Human Leucocyte Antigens (HLA) da denilebilen majör histokompatibilite kompleksinin transplantasyonda rol oynadığının ilk ışıkları 1962 yılında yapılan küçük bir retrospektif çalışmadan gelmiştir (3). Terasaki ve grubu ise 1968 yılında yaptıkları detaylı bir retrospektif çalışmada HLA uygunluğu ve kadavradan yapılan böbrek transplantasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır (4). Bu araştırmacılar beş majör antijen baktıkları hastalarında HLA uygun transplant yapılanların kreatin klirenslerinin daha düşük olduğu ve rejeksiyon ataklarının sayısının daha az olduğunu görmüşlerdi . O zamandan beri yapılan çok sayıdaki çalışmaların büyük çoğunluğu da bu sonuçları desteklemiştir.. Siklosporinin transplantasyon alanında kullanıma girmesinden sonra HLA uygunluğunun artık faydalı olmadığı bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüşse de bunun doğru olmadığı

anlaşılmiştir. Siklosporin kullanan 40.000 hastalık çok merkezli bir çalışmada HLA antijenleri arasında uygunluk olduğunda yapılan transplantasyonlarda 10 yılda graft yaşamı canlı donör kullanıldığında % 88 , kadaverik donör kullanıldığında % 52 olarak bulunmuştur (5). HLA antijenleri arasındaki uygunluk derecesi kötü olan transplantasyonlarda ise bu rakamlar canlı donör kullanıldığında %49, kadavra donör kullanıldığında %31 idi.

İnsanda majör histokompatibilite kompleksine HLA kompleksi de denir. HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde 4 santimorganlık bir alan kaplar. HLA lokusu üzerinde 7 genetik locus belirlenmiştir: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR, HLA-DP ve HLA-DQ. HLA kompleksi üzerinde olduğu bilinen başka genler de vardır (C2, C4 ve properdin gibi). HLA lokusları son derece polimorfiktir. HLA-A lokusunda 23, B lokusunda 47 ve C lokusunda 8 allel vardır ve bunların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bir kromozom üzerindeki farklı lokuslardaki allellerin birbirine çok yakın olması nedeni ile bunlar ebeveyden çocuğa birlikte nakledilirler. Anne ve babadan birer kromozom geldiğine göre her insanda biri anneden , diğeri babadan gelen iki HLA haplotipi vardır.

Dokulardaki dağılımlarına ve strüktürlerine göre HLA antijenleri iki sınıfa ayrılır. Sınıf I antijenler HLA-A, B, C; Sınıf II antijenler ise HLA-D, DR, DP, DQ dur. Sınıf I antijenler hemen bütün hücrelerde bulunur. Sınıf I HLA molekülleri 44.000 molekül ağırlığındaki çok polimorfik olan bir glikoprotein ve 15. kromozomdaki bir genin ürünü olan 12.000 molekül ağırlığındaki non-polimorfik  $\beta_2$ -mikroglobulinden oluşur. Polimorfik bölge 338 aminoasitten (AA) oluşup üç bölgeye ayrılır: Ekstrasellüler hidrofilik bölge (1-281), transmembranöz hidrofobik bölge (282-306) ve intrasellüler hidrofilik bölge (306-338). Ekstrasellüler bölge



de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ve  $\alpha_3$  olmak üzere üç kıvrımdan oluşur. Sınıf II antijenleri ise monositlerde, B lenfositlerinde ve aktive olmuş T lenfositlerinde bulunur. Bu antijenlerin molekülleri non-kovalent olarak birbirine bağlanmış moleküler ağırlıkları 34.000 ve 29.000 olan iki glikoprotein zincirinden oluşur.

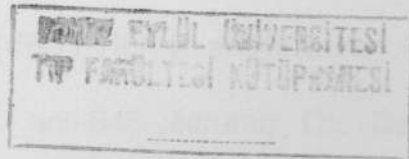
Son yıllarda transplantasyon immunolojisi alanındaki en büyük gelişmeler arasında HLA molekülünün kristalografik inceleme sonucu üç boyutlu yapısının anlaşılması (6) ve HLA moleküllerinin AA sekanslarının ortaya konması sayılabilir (7). Bugün yaklaşık olarak 50 kadar HLA molekülünün AA sekansı bilinmektedir.

Günümüzde, HLA uygunsuzluğu denilince donörde alıcıda olmayan HLA antijenlerinin mevcut olduğu anlaşılır. Ancak, gittikçe artan sayıda HLA antijeninin AA sekanslarının ortaya konmuş olmasına paralel olarak HLA uygunsuzluğunun tarifindeki bu hep veya hiç yaklaşımının gözden geçirilmesi gerekmektedir. Örneğin, uygunsuz HLA antijeninin AA sekansı polimorfik bölgede ( $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  kıvrımları) hastanın kendi HLA antijeninden 9 AA (HLA-A30 'a karşı A3) veya 24 AA (HLA-A30'a karşı A24) gibi değişik sayıda AA farklılığı içerir. Bu nedenle HLA-A30 antijeni taşıyan bir kişinin HLA-A24'e göstereceği immun yanıtın HLA-A3'e göstereceği immun yanıtından daha kuvvetli olması beklenebilir. Ayrıca, bir HLA antijeninin immunojenitesi sadece farklı AA'lerin sayısına bağlı değil ; aynı zamanda bu AA rezidülerinin natürüne ve HLA molekülü üzerindeki lokalizasyonlarının erişilebilir ( $\alpha$  sarmalı) veya erişilemez ( $\beta$  kırmalı tabakası) olmasına da bağlıdır (7). Bu bilgilerin ışığı altında öz ve yabancı HLA molekülleri arasındaki her farklı AA substitusyonu potansiyel bir epitop olarak kabul edilebilir (8). Böyle bir yaklaşımda öz ve yabancı HLA molekülleri aynı pozisyonda aynı substitusyonlara sahipse bu pozisyon için



HLA molekülleri arasında uygunluk olduğu kabul edilir. Ancak bu uygun rezidüler HLA molekülünün başka yerlerindeki farklı substitusyonlarla interaksiyona girerek antijenik bir epitopun oluşturulmasına katkıda bulunabilirler. Eğer bu doğruysa bir AA rezidü farklılığı tek başına değil fakat öz ve yabancı HLA molekülleri arasındaki diğer farklılıklar da dikkate alınarak değerlendirilmelidir. Bu çalışmada bu olasılık araştırılmıştır.

HLA B62 ve HLA B46 molekülleri  $\alpha_1$  kıvrım'ının  $\alpha$  heliksi üzerindeki bir segmentindeki 7 AA hariç birbirlerinin aynıdırlar. Dolayısıyla B62'ye bağlanıp B46 molekülüne bağlanmayan antikörlerin epitoplarına bu 7 AA'in bir veya daha fazlasının katkıda bulunması gerekir. Bu çalışmada HLA antijenlerinden birisinin 66 ve 76. AA'leri arasındaki AA segmenti, HLA B62 ile identik olan sensitize olmuş hastaların serumları kullanıldı. Amacımız bu hastaların B62'ye bağlanan, fakat B46 'ya bağlanmayan antikörlere sahip olup olmadığını görmektir. Böylece yabancı HLA molekülü üzerindeki hastanın öz HLA antijenlerine identik olan rezidülerin epitop oluşumuna katkıda bulunup bulunamayacağını anlamak mümkün olacaktır.



## MATERYEL VE METOD

**Hücreler:** *Onuncu Uluslararası Workshop'ta tanımlanan HTH'ler (9), ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) kanalıyla temin edildi (Tissue Typing Laboratory, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA). Hücre kültürleri % 10 fetal dana serumu, % 1 L-glutamin, 10<sup>6</sup> IU/L penisilin, 0.1 g/L streptomisin, 50 mg/L gentamisin, 0.25 mg/L amfoterisin içeren RPMI 1640 besiyerinde % 6 CO<sub>2</sub> içeren nemli hava ortamında muhafaza edildiler. Bu çalışmada kullanılan HTH'lerin fenotipleri daha önce serolojik (10) ve biokimyasal (11) tekniklerle tayin edilmiştir. HTH 9031 (A2,B62) B62.3 subtipine sahiptir (11). Bu, HLA-B62'nin sahip olduğu beş variantı arasında en sık rastlanandır. HLA-B62'nin bütün variantlarının sekansları yakın zamanda bildirilmiştir (12). B62.3'ün AA sekansı daha önce B62 olarak yayınlanan sekansın aynısıdır (13).*

**Hastalar ve Serumlar:** Bu çalışmada kullanılan serumların temin edildiği yedi hastanın hepsi de renal transplant adaylarıydı. Beş hasta (#1-5) 66-76. AA segmenti B62 ile aynı olan en az bir HLA-B antijenine sahipti. İki hastanın (#6-7) HLA-B antijenlerinin 66-76. AA segmenti HLA-B62'den farklıydı. Monospesifik anti-B46 serumu Dr. Dasnayanee Chandanayingyong'un ( Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand) nazik bir hediyesiydi .



**Monoklonal Antikorlar:** BB7.1, W6/32 ve L243 hybridoma'ları American Type Culture Collection'dan (Rockville, MD) temin edildi. BB7.1 HLA-B7'yi tanır. W6/32 Sınıf I, L243 Sınıf II HLA antijenleri üzerindeki polimorfik olmayan determinantlara bağlanır.

**Absorpsiyon ve elusyon Çalışmaları:** Hücreler ( $50 \times 10^6$ /ml olacak şekilde)  $4^\circ\text{C}$  de 2 saat serum ile enkübe edildikten sonra santrifüje edilerek absorbe edilmiş serum ayrıldı. Eluatların oluşturulması için, ilk absorpsiyonda kullanılan HTH'ler % 0.1 sodyum azid içeren fosfat tamponlu tuzlu solusyonda (FTS) 6 kez yıkandı ve elusyon tampon solusyonu ile (0.05 M glisin-HCl, 0.15 M NaCl, pH 2.3)  $4^\circ\text{C}$  de 30 dakika enkübe edildi. Kullanılan tampon elusyon solusyonunun miktarı başlangıçta kullanılan serum miktarının yarısı kadardı. Santrifüje edildikten sonra eluat toplandı ve 1 M Tris base, pH 9.0 ile pH 7.2 ye tamponlandı ve kullanılıncaya kadar  $-80^\circ$ de muhafaza edildi. Absorbe serum veya eluatları elde etmek için absorpsiyon işlemi aynı hücre/ volum oranı kullanılarak iki kez tekrarlandı. Sınıf II antikorları yok etmek için önceden asit elusyon tamponu ile enkübe edilmiş HTH'ler ile absorpsiyon yapıldı. HTH'ler 4 dakika  $40 \mu\text{l}/10^6$  olacak şekilde asit elusyon tamponunda bekletilerek absorpsiyon için kullanılmadan önce iki defa yıkandılar. Sınıf I Antijenlerine karşı olan Antikor'ları yok etmek için karışık trombosit süspansiyonları ile (Scantibodies, Santee, CA) de absorpsiyonlar yapıldı. Serum veya eluat eşit hacimdeki trombosit kitlesi ile iki kez (2 saat, oda sıcaklığında) absorbe edildi. Hastaların serumları başlangıçta 30 hücreli bir panelde konvansiyonel sitotoksisite ile test edilerek % 40'ın üzerinde panel reaktivitesine sahip olduğu gösterilmişti. Absorbe serumda absorpsiyon için kullanılan hücrelere karşı reaktivitenin kaybolduğu ve eluatta bu reaktivitenin tekrar

ortaya çıktığı her basamakta test edilerek absorpsiyon ve elusyon prosedürünün etkinliği kontrol edildi.

**Komplemana bağlı sitotoksosite:** Modifiye-Amos NIH tekniği kullanıldı (14).

**Flow Sitometre:** HTH'ler ( $5 \times 10^5$  hücre/tüp) 10  $\mu$ l serum , 20  $\mu$ l eluat veya 50  $\mu$ l monoklonal antikor ( doku kültürü süpernatantı) ile enkübe edildiler. FTS ile üç kez yıkandıktan sonra hücreler floresanla konjuge edilmiş  $F(ab)_2$  keçi anti-human IgG (Cappel, West Chester, PA) veya monoklonal antikorlar için floresanla konjuge edilmiş koyun anti-fare IgG (Cappel) ile tekrar enkübe edildiler. Hücre analizi logaritmik skalada 10 000 hücre sayarak FACSTAR da (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) yapıldı. Sonuçlar ortalama kanal floresans yoğunluğu veya test edilen örneğin ortalama kanal floresansının negatif kontrolününe oranı olarak verildi. Hastanın serumu için (absorbe edilmiş veya edilmemiş) negatif kontrol olarak normal serum, eluat için ise FTS negatif kontrol olarak kullanıldı. Bütün deneylerde kullanılan normal serum aynı idi ve alloimmunizasyon göstermeyen bir şahıstan alınmıştı. Immunize olmamış diğer 5 kişiden alınan serumlar farklı HTH'lerle test edilip sonuçlar kontrol olarak kullanılan normal seruma oran olarak verildiğinde, elde edilen ortalama oran  $1.2 \pm 0.2$  (ortalama  $\pm$  SD) idi. Bu yüzden 1.8 den büyük (ortalama + 3 SD) oran değerleri pozitif ve 1.6 dan küçük ( ortalama + 2 SD) olan oran değerleri negatif olarak kabul edildi. Elde edilen aradaki değerler pozitif veya negatif olarak değerlendirilmeden önce bu deneyler tekrarlandı. Sınır değerlerinin saptanması için birçok eluat spesifik bir HTH ile absorbe edildikten sonra aynı HTH'lere karşı test edildi



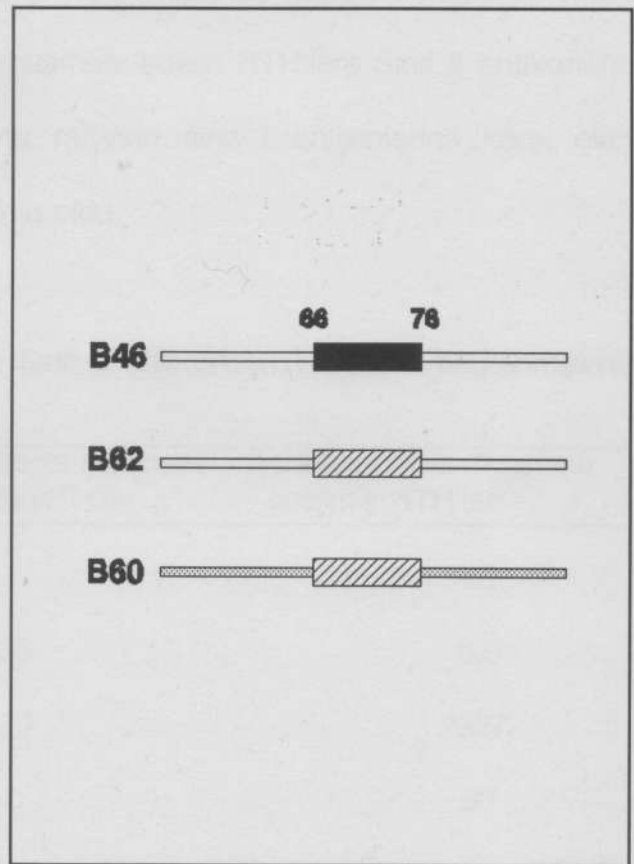
(n=38). Sonuçlar negatif kontrol'un FTS'ye oranı olarak verildiğinde ortalama oran  $1.09 \pm 0.24$  idi. Bu değerler yukarıda aıklanđı gibi pozitif ve negatif sınır değerlerini belirlemek için kullanıldı (15).

Flow sitometre Candida Albicans'a karşı antikorları araştırmak için de kullanıldı. Organizmalar klinik laboratuvarındaki taze kültürlerden alınıp, kullanmadan önce %10 formolde fikse edildiler.

**Istatistiksel analiz:** Antikor reaktivitesinin yayınlanmış sekanslardaki belirli bir pozisyondaki AA'in varlığı ile birlikteliği Fisher testi ile araştırıldı.

## SONUÇLAR:

**Deneysel yaklaşım:** Figür 1’de görüldüğü gibi yedi pozisyonda farklılık gösterdikleri 66 ve 76. pozisyonlar arasındaki segment hariç HLA-B62 ve HLA-B46 birbirlerinin aynıdır. Bu nedenle B62’yi tanıyıp B46’yı tanımayan bir antikor (ister spontan olarak oluşmuş olsun, isterse B46 pozitif HTH’lerle absorpsiyon yapılarak B62 spesifik hale getirilmiş olsun) B62 molekülü üzerindeki 66 ve 76. pozisyonlar arasındaki bir veya daha fazla AA rezidüsünü tanımak zorundadır. Eğer antikoru yapan kişinin kendisi 66 ve 76. pozisyonlar arasındaki AA segmenti B62’nin aynı olan, örneğin B60 antijenini taşıyorsa bu bize yabancı HLA molekülü üzerindeki kişinin kendi HLA antijenlerindekiyle aynı olan rezidüleri de tanıyabileceğini gösterecektir.



Figür 1: HLA-B46, B62 ve B60’ın  $\alpha_1$  kıvrımlarının primer strüktürlerinin şematik olarak karşılaştırılması.



**Sınıf II antikorların absorpsiyonu:** HTH'ler hem sınıf I ve hem de sınıf II antijenleri eksprese ettikleri için, hasta serumlarının sınıf II antijenlere karşı antikor içermediklerini göstermek önemliydi. Ancak trombositlerle yapılan absorpsiyonun bazı hastaların serumlarındaki aktivitenin tamamını yok etmemesi bu hastaların serumlarında sınıf II antikorların bulunduğunun bir işaretiydi. HTH'lerin asid tamponla muamele edilince  $\beta_2$ -mikroglobulin sınıf I HLA antijeninin ağır zincirinden ayrılarak HLA molekülünün tersiyer yapısının bozulduğu bilinmektedir. Sınıf I HLA antijenlerini tanıyan gerek alloantikorlar (16) gerekse monoklonal antikorlar (17) artık tersiyer yapısı değişmiş moleküle bağlanamazlar. Tablo 1'de görüldüğü gibi asid tamponla muamele edilen HTH'lere Sınıf II antikorların bağlanabilmesinde bir azalma olmamasına rağmen sınıf I antijenlerine karşı olan antikorların bağlanmasında belirgin bir azalma oldu.

**TABLO 1. Asidle muamelenin Sınıf I ve Sınıf II antikorların HTH'lere bağlanmasına etkisi<sup>1</sup>**

	Asid tamponla muamele edilmemiş HTH'ler	Asid tamponla muamele edilmiş HTH'ler
BB7.1 <sup>2</sup> (anti-HLA-B7)	35	40
W6/32 (anti-sınıf I)	1683	109
L243 (anti-sınıf II)	2170	2327
Normal insan serumu	27	50
Hasta #7 (anti-sınıf I)	1242	54

<sup>1</sup>Sonuçlar ortalama kanal floresans intensitesi olarak gösterilmiştir. Hedef HTH olarak monoklonal antikorlar için #9031 (A2,B62) ; ve normal insan serumu için #9007 (A2,B57) kullanıldı.

<sup>2</sup>Diğer monoklonal antikorlar için negatif kontrol olarak BB7.1 kullanıldı.

Asit tamponla muamele edilmiş HTH'lerle absorpsiyon yapıldıktan sonra spesifik bir HTH'ye karşı sınıf I antikorlara sahip olduğu bilinen hasta serumunun (çünkü bu serumlardaki tüm reaktivite trombosit absorpsiyonlarından sonra kayboluyordu) hedef HTH'ye karşı gösterdiği reaktivitede bir değişiklik olmadı. Bundan sonraki deneylerde kullanılan bütün antikor preparasyonları gerektiğinde önceden asit tamponla muamele edilmiş HTH'lerle absorbe edilerek sınıf II antikorlardan temizlendi. Trombosit absorpsiyonlarıyla aktivitelerinin kaybolduğu kontrol edilerek sadece Sınıf .I HLA antikorlarını içerdikleri gösterildi.

**HLA-B46 ile çapraz reaksiyon göstermeyen anti-B62 antikorların elde edilmesi:** 66 ve 76. AA'ler arasındaki segmenti HLA-B62'nin aynı olan en az bir HLA-B antijeni taşıdıkları için seçilen 48 sensitize hastanın serumlarını inceledik. Beş serum HTH 9066 (A2,B46) ile absorbe edildikten sonra hala HTH 9031'e (A2,B62) karşı belirgin reaktivite gösteriyordu (Tablo 2, sütun 1 ve 2). Bu hastalar şu HLA antijenlerinden bir veya ikisini taşıyorlardı: HLA-B44, B37, B47, B60. Bu antijenler 66-76. pozisyonundaki rezidülerde HLA-B62 ile identiktirler.

**HLA-B46 ile çapraz reaksiyon göstermeyen anti-B62 antikorların reaktivitesi:** HLA-B62'yi tanıyıp B46'yı tanımayan antikorlara sahip bu beş hastanın üçünün bundan sonraki deneylerde kullanmaya yetecek serumu vardı. Ayrıca, HLA-B antijenlerinin 66-76. pozisyonlar arasındaki AA segmenti B62 den farklı olan iki hastanın serumu da kullanıldı (Hasta 6,7). Bu hastaların serumları önce HTH 9031 (A2,B62) ile absorbe ve elue edildi. Elde edilen eluatlar daha sonra HTH 9066 (A2,B46) ile absorbe edildi. Anti-sınıf II

Tablo 2 Asidle muamele edilmiş HTH'ler ve trombositlerle absorpsiyonun etkisi<sup>1</sup>.

Serum	HLA tipi	HTC 9031 (A2,B62)'ye karşı reaktivite					HTC 9066 (A2,B46)'ye karşı reaktivite
		1	2	3	4	5	6
Sütun		1	2	3	4	5	6
Abs'da kullanılmış HTC #		-	9066	-	9066	9066	9066
Abs'da kullanılmış asidle muamele edilmiş HTC #		-	-	-	9031	9031	-
Trombositlerle absorpsiyon		-	-	Evet	Hayır	Evet	-
Hasta #1	A2,23;B44	326	156	30	-	-	41
Hasta #2	A2,24;B14,37	266	142	46	-	-	43
Hasta #3	A24,30;B60	892	374	124	177	26	22
Hasta #4	A2,34;B44,47	834	402	446	182	30	32
Hasta #5	A2,28;B44	1038	410	406	217	30	32
Normal serum		32-40					24-31

<sup>1</sup>Sonuçlar ortalama kanal floresans intensitesi olarak gösterilmiştir.

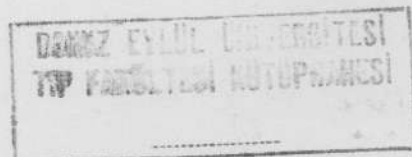


antikorları içerdği bilinen bir hastadan elde edilen eluat ilaveten asitle muamele edilmiş HTH'lerle absorbe edildi. Bu nedenle elde edilen en son preparasyon sadece HLA-B62'ye bağlanıp B46'ya bağlanmayan antikorları içeriyordu (Tablo 3). Bu eluatların bir HTH paneline karşı reaktivitesi flow sitometre'de ölçüldü (Tablo 4). Eluatların reaktivite gösterdiği ve göstermediği farklı HTH'lerden yararlanarak her hastanın tanıdığı HLA antijenleri saptandı (Tablo 5).

**Hasta #1 :** Eluat 16 HTH'den 8'ine karşı reaktivite gösterdi. HLA-B8, B18, B35 or B51'den herhangi birini taşıyan HTH'lerle yapılan absorpsiyonun B62'ye karşı tüm reaktiviteyi ortadan kaldırması preparasyondaki antikor aktivitesinin bir veya birkaç antikora bağlı olduğunun bir kanıtıydı. Antikoru bağlayan HLA antijenlerinde bulunan ve antikorun bağlanmadığı HLA antijenlerinde bulunmayan 41-43. pozisyondaki alanin-serin-pirolin antikor reaktivitesi ile istatistiksel bakımdan anlamlı bir korelasyon gösterdi (Tablo 5).

**Hasta #2 :** Bu antikor 11-12. pozisyonda alanin-metionin ve 74. pozisyonda tirozin taşıyan HLA antijenlerini tanıdı ( $p < 0.0008$  ve  $p < 0.002$ , sırasıyla). Bu rezidülere sahip olduğu halde antikoru bağlamayan tek HLA antijeni B44 idi. B44 hariç antikorun tanıdığı bütün HLA antijenleri hem 11-12. pozisyonda alanin-metionin ve hem de 74. pozisyonda tirozin taşıyorlardı ( $p < 0.00004$ ). HLA molekülünün üç boyutlu yapısında 11-12. ve 74. pozisyonların birbirine çok yakın olması dikkat çekicidir.

**Hasta #3 :** Bu antikor test edilen HLA antijenlerinden sadece HLA-B35 ve B62'yi tanıdı. Bu hasta 47-90. pozisyonlar arası (bu  $\alpha_1$  kıvrımının bütün  $\alpha$  heliksini kapsar) B62'nin aynı olan HLA-B60 antijenini taşımaktadır. Bu iki molekülün  $\alpha_1$  kıvrımlarındaki farklılıklar  $\beta$



kırmalı tabakasında yerleşik olan 9, 24, 32, 41, 45 ve 46. pozisyonlardır.  $\alpha_2$  kıvrımında 66-76. AA segmenti ile kıvrımlar arası kontakt yapan rezidüler 95, 97 ve 99. pozisyondaki AA'ler olup (2) bu pozisyonlardaki AA'ler B62 ve B60'ın her ikisinde aynıdır. Dolayısıyla bu B62 epitopunun tanınması için yukarıda belirtilen  $\alpha_1$  kıvrımının  $\beta$  katmanlarında yerleşik B60 ve B62 arasında farklılık gösteren rezidüler rol oynamalıdır. 24. pozisyondaki alanin ve 66. pozisyondaki izolösin antikor bağlanması ile korelasyon gösterdiler. Molekülün üç boyutlu yapısında her iki rezidü birbirlerine çok yakındır.

**Hasta #6:** B57'yi tanımanın dışında bu antikorun reaktivitesi 3. hastaninkine büyük benzerlik göstermekteydi. Bu antikorun B57'ye karşı reaktivitesi zayıf olmakla birlikte tekrarlanan deneylerde zayıf pozitiflik sebat etti. 74. pozisyondaki tirozin ve 24. pozisyondaki alanin antikor reaktivitesi ile korelasyon gösterdi.

**Hasta #7:** Bu eluat test edilen 14 HTH'den 10'unu tanıdı. 11-12. pozisyonlardaki alanin-metionin ( $p < 0.008$ ), 69-71. pozisyonlardaki treonin-asparajin-treonin ( $p < 0.007$ ), 74. pozisyondaki tirozin 74 ( $p < 0.007$ ) ve 113. pozisyondaki histidin ( $p < 0.03$ ) antikor reaktivitesi ile istatistiksel bakımdan anlamlı korelasyon gösterdiler. Fakat, daha önce yaptığımız bir çalışmadan biliyoruz ki bu hastanın serumunda B62'ye bağlanan fakat B46'ya bağlanmayan en az iki tip antikor mevcuttu (14).

**Monospesifik anti-B46 serum:** Monospesifik olduğu bilinen bir anti-B46 serum 10 HTH'lik bir panele karşı flow sitometrede test edildi. Bu serum sadece HLA-B46 eksprese eden HTH'lere karşı reaktivite gösterip, diğer HTH'lere bağlanmadı.

TABLO 3. Asidle muamele edilmiş 9066 HTH'lerle absorbe edildikten sonra B62 spesifik eluatın reaktivitesi.<sup>1</sup>

Hasta	Hedef HTH	
	9031 (A2,B62)	9066 (2,46)
Hasta #1	195	38
Hasta #2	186	38
Hasta #3 <sup>2</sup>	105	30
Hasta #6	105	29
Hasta #7	250	42
FTS	26-28	26-31

<sup>1</sup>Sonuçlar ortalama kanal floresans intensitesi olarak gösterilmiştir.

<sup>2</sup>Bu hastadan elde edilen eluat asidle muamele edilmiş HTH'lerle absorbe edilerek sınıf II antikorlardan temizlenmişti.



**TABLO 4. HTH paneline karşı antikor reaktivitesi.**

HTH <sup>1</sup>	31	66	33	86	46	38	67	68	09	26	43	54	47	16	07	75
HLA-A	2	2	3	1	2	2	2	2	1	26	1	2	3	2	2	24
HLA-B	62	46	7	8	13	18	27	35	37	38	41	44	47	51	57	60
Hasta 1 A2,23; B44	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Hasta 2 A2,24.B14,37	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Hasta 3 A24,30; B60	+	-			-	-	-	+		-	-	-	-		-	-
Hasta 6 A2,3;B7,8	+	-	-	-	-	-	-	+			-	-	-	-	+	-
Hasta 7 A2,34; B7	+	-	-	+	+	+	-	+			+	-	+	+	+	+

<sup>1</sup>HTH numaraları 4 basamaklıdır. Bütün hepsinin ilk iki rakamı 90'dır kolaylık için tabloda sadece son iki rakam belirtilmiştir.

**TABLO 5. Hastaların antikorlarının HLA antijen ve epitop spesifisiteleri.**

	Hastalar				
	1	2	3	6	7
Antikoru bağlayan HLA Antijenleri	B7	B13	B35	B35	B8
	B8	B35	B62	B57	B13
	B18	B41		B62	B18
	B35	B47			B35
	B37	B51			B41
	B51	B57			B47
	B57	B60			B51
	B62	B62			B57 B60 B62
Antikoru bağlamayan HLA antijenleri	A1	A1	A1	A1	A2
	A2	A2	A2	A2	A3
	A3	A3	A3	A3	B7
	A24	A24	A24	A24	B27
	A26	A26	A26	B7	B44
	B13	B7	B13	B8	B46
	B27	B8	B18	B13	
	B38	B18	B27	B18	
	B41	B27	B38	B27	
	B44	B37	B41	B41	
	B46	B38	B44	B44	
	B47	B44	B46	B46	
	B60	B46	B47	B47	
			B57	B51	
			B60	B60	
AA pozisyon no	41 42 43	11 12 74	24 66	24 74	74 <sup>1</sup>
p değeri	0.0008	0.00004	0.007	0.005	0.007

<sup>1</sup>11-12, 69-71 ve 113 . pozisyonadaki AA substitusyonları da bu antikorun reaktivitesi ile istatistiksel bakımdan anlamlı korelasyon gösteriyordu.

## TARTIŞMA

HLA antijenlerinin moleküler düzeyde yapısı hakkındaki bilgiler arttıkça, transplantasyondaki önemi bilinen HLA antijenlerinin uygunluğunun geliştirilmesi yönünde yeni fikirlere ihtiyaç vardır. Yabancı bir HLA antijeninin immunojenitesi, muhtemelen, bu antijenin hastanın kendi HLA antijenlerinden moleküler düzeyde ne kadar farklılık gösterdiğine bağlıdır. Bu farklılıklar moleküller arasındaki farklı AA substitusyonlarının sayısı, natürü ve yerleşimleriyle ifade edilebilir. Ancak, bu farklılıkların nasıl analiz edilebileceği konusu halen açık değildir. Örneğin HLA-B46, B60 pozitif bir hasta için HLA-B62 antijenik özelliktedir. HLA-B62 ile B46 66, 67, 69, 70, 71, 74, ve 76. pozisyonlarda farklı AA'lere sahiptirler. Fakat hastanın diğer HLA antijeni , B60, 66-76. pozisyonlar arasındaki segmentte B62'den hiçbir farklılık göstermez. Dolayısıyla yabancı ve öz HLA antijenleri arasındaki farklılıklar analiz edilmek istendiğinde iki yöntem seçilebilir. Bir yöntemde, hastanın kendi HLA antijenlerinden bir tanesi yabancı HLA antijeniyle mukayese edilmek üzere seçilir. B60 ve B62  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  kıvrımlarında 14 pozisyonda farklı AA içerirler. B46 ve B62 arasındaki fark ise 7 AA'tir. Bu B60 ile B62 arasındaki farktan daha az olduğu için burada karşılaştırmalı analiz için hastanın HLA antijenlerinden B46 seçilmelidir. Diğer bir yöntemde, hasta ve donör HLA antijenlerinin karşılaştırmalı analizi yapılırken hastanın HLA antijenlerinden birisinin seçilmesi yerine hastanın bütün HLA antijenleri birlikte değerlendirilmeye alınır. Yukarıdaki örnekte B62'nin B46'dan farklılık gösterdiği AA segmentine B60 aynen sahip olduğu için böyle bir analiz yapıldığında hasta ile yabancı HLA antijeni arasında farklılık gösteren AA sayısı 0'dır. Böyle bir analizin haklılığı yukarıdaki



örnekteki 66, 67, 69, 70, 71, 74, ve 76. pozisyonlardaki AA'lerin alıcı tarafından farklı olarak görülüp görülmediğine bağlıdır.

Bu sistemde (Figür 1), B62'yi tanıyıp B46'yı tanımayan bir antikor mutlaka 66-76. AA'leri tanıyor olmalıdır. 66-76 AA segmenti B62 ile identik olan bir HLA antijenine sahip olan hastalar böyle bir antikor bu çalışmada görüldüğü gibi geliştirebildiğine göre bu segmentin hastanın HLA antijenleriyle uygun olduğu söylenemez. B62'nin beş subtipi vardır (12) ve 9031 HTH'deki B62 nin biokimyasal olarak B62.3 olduğu gösterilmiştir. Bu subtipin AA sekansı daha önce yayınlanan B62 ile aynıdır (13).

Yaptıkları B62+ B46- antikorun spesifitesini araştırabildiğimiz 5 hastadan 4'ünün ürettikleri antikorun reaktivitesi 66-76 segmentindeki bazı AA'lerin varlığı ile korelasyon gösteriyordu (Tablo 5). Bu antikorların reaktivitesi molekülün başka bölgesindeki rezidülerin varlığı ile de korelasyon gösteriyordu ki bunlar molekülün üç boyutlu yapısı göz önüne alındığı takdirde 66-76. pozisyonlara çok yakındılar. Bu sonuçlar, 66-76 AA segmentinde yerleşmiş bazı AA'lerin üç boyutlu yapıda kendilerine yakın bulunan bu rezidülerle etkileşim içine girerek antikorun bağlanması için epitop oluşturduklarını düşündürür. Birinci hastadaki antikor 66-76. pozisyonlardaki rezidülerle korelasyon göstermediği gibi, B46 molekülünde de bulunan 41-43. pozisyonlardaki AA'leri tanıyor gözükte. Mümkündür ki B46 molekülündeki 66-76. AA segmentindeki rezidülerden bir veya birkaçı bu antikorun B46'ya bağlanmasını engellerler. Bu antikorun 66-76. AA segmentinde B62 ile hemen hiç benzerliği olmayan, fakat 41-43. pozisyonlarda B62'ye identik olan B7'ye bağlanması da bu görüşü destekler.

Belirlenmiş bir epitop tanıyan antikorun epitopa bağlanmasının molekülün başka

bölgelerindeki değişikliklerden etkilendiğinin literatürde örnekleri vardır. Fare sınıf II moleküllerinin  $\alpha$  zincirindeki Ia polimorfizmini tanıyan monoklonal antikoların  $\beta$  zincirindeki spesifik polimorfizme bağlı olduğu gösterilmişti (18). Anti-HLA sınıf I monoklonal antikoları için de benzer bir örnek vardır. MB40.2 monoklonal antikoru HLA-B42 molekülünün  $\alpha_2$  zincirindeki 177-180. pozisyonları tanır. Ancak bu antikor tüm  $\alpha_2$  zinciri B42'ye identik olan B8 molekülüne bağlanmaz (19). Benzer şekilde HLA-B7'yi tanıyan üç tane monoklonal antikorun moleküle bağlanması, epitopik bölgelerin dışında olan ve erişilebilir bir konumu da olmayan 45. pozisyondaki rezidünün mutasyonu ile ortadan kaldırılabilmişti (20). Bütün bunlar gösteriyor ki bir HLA antijeninin immunolojik olarak tanınabilmesinde, farklı kıvrımlarda yerleşik ve hatta erişilemez konumdaki rezidülerin interaksiyonu sonucu oluşan konformasyonel değişiklikler rol oynayabilir. HLA molekülünün ortasındaki olukta yerleşik peptidin benzer şekilde değişiklikler yapabilir yapamayacağını araştırılması gerekir.

Bu çalışmanın sonuçları gösteriyor ki iki HLA antijeni arasındaki spesifik pozisyonlardaki AA farklılıklarının analizi diğer pozisyonlardaki farklılıklar da göz önüne alınmadan HLA antijenleri arasındaki uygunluk derecesini belirlemede yardımcı olamaz. Diğer yandan iki HLA antijeni arasındaki farklı AA'lerin toplam sayısının, bu HLA antijenlerinin birbirleri için antijenik olma kapasiteleriyle orantılı olmasını düşünmek akla yatkındır. Ancak iki veya daha fazla uygunsuz HLA antijeni bulunduğu durumlarda moleküler düzeyde uygunluk analizinin nasıl yapılacağı henüz belli değildir. Bu alanda yapılacak benzer çalışmalar moleküler düzeydeki analizin en iyi nasıl yapılması gerektiğini aydınlatmaya katkıda bulunacaktır.

## ABSTRACT:

Applying absorption-elution techniques with homozygous typing cells and flow cytometry, a number of alloantibodies that recognized HLA-B62 but not B46 were identified. B62 and B46 are identical except in amino acids 66-76, which are probably recognized by the B62-specific antibodies. The patients who made these antibodies, however, had HLA antigens sharing amino acids 66-76 with B62, indicating that residues that are identical to the patient's own contribute to the antigenic determinants of foreign HLA molecules. Fine specificity analysis of most of these antibodies revealed that they recognized residues in the 66-76 segment in addition to other residues which were located in close proximity to this segment. We conclude that mismatched amino acid residues located in one part of the HLA molecule can interact with residues that are not different from those in the patient's own HLA molecules to form epitopes recognizable by alloantibodies. These findings should be helpful in improving our understanding of how to use current knowledge at the molecular level for the purpose of matching transplant donors and recipients.



## KAYNAKLAR:

1. Dausseut J. Iso-Leuco anticorps. *Acta Haematol* 20: 156-166, 1958.
2. Van Rood JJ, Van Leeuwen A. Leucocyte grouping, a method and its application. *J Clin Inv* 42: 1382-1390, 1963.
3. Hamburger J, Vaysse J, Crosnier J, et al. Renal transplantation in man after irradiation of the recipient. *Am J Med* 32: 854-871, 1962.
4. Vredevoe TL, Terasaki PI, Mickey MR, et al. Serotyping of human leucocyte antigens. III. Long term kidney homograft survivors. *Histocompatibility testing* 11: 25-36, 1965.
5. Opelz G. Long term effect of HLA matching on kidney graft survival in Cyclosporin treated patients. XIII International Congress of the Transplantation Society, symposium and poster abstracts 1990: 208.
6. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of Class I major histocompatibility molecules. *Ann Rev Biochem* 59: 253, 1990.
7. Bjorkman PJ, Saper MA, Samroï B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human I class histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506, 1987.
8. Terasaki PI, Park MS, Takemoto S, Cecka JM, Clark B, Corcoran S, Ciciarelli J, Barbetti A, Yuge J, Carnahan E. Overview and epitope matching. IN: P Terasaki(ed). *Clinical Transplants*, Los Angeles UCLA Tissue Typing Laboratory, 1990, pp. 499.
9. Yang SY, Milford E, Hammerling U, Dupont B. Description of the reference panel

- of B-lymphoblastoid cell lines for factors of the HLA system: The B-cell panel designed for the Tenth International Histocompatibility Workshop. IN: B Dupont (ed): The Immunology of HLA, Vol 1, Immunogenetics and Histocompatibility. New York, Springer-Verlag, 1989, pp. 11.
10. Milford EL, Kennedy LJ, Yang SY, Dupont B, Lalouel JM, Yunis EJ. Serologic characterization of the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines for factors of the HLA system. IN: B Dupont (ed): The Immunology of HLA, Vol 1, Immunogenetics and Histocompatibility. New York, Springer-Verlag, 1989, pp. 19.
  11. Yang SY. Assignment of HLA-A and HLA-B antigens for the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines determined by one dimensional isoelectric focusing (ID-IEF) gel electrophoresis. IN: B Dupont (ed): The Immunology of HLA, Vol 1, Immunogenetics and Histocompatibility. New York, Springer-Verlag, 1989, pp. 43.
  12. Choo SY, Fan LA, Hansen JA. Five alleles in the HLA-Bw62 antigen family and their differences in the antigen peptide presentation. Human Immunol, ASHI 16th Annual Meeting, 1990, pp. 18 (Abstract).
  13. Pohla H, Kuon W, Tobaczewski P, Doerner C, Weiss EH. Allelic variation in HLA-B and HLA-C sequences and the evolution of the HLA-B alleles. Immunogenetics 29: 297, 1989.
  14. Amos DB, Bashir H, Boyle W, et al. A simple microcytotoxicity test. Transplantation 7, 220-222, 1969.
  15. Akkoc N, Scornik JS. Intramolecular specificity of anti-HLA alloantibodies. Human Immunology 30: 91-98, 1991.

16. Kurata Y, Oshida M, Take H, Furubayashi T, Mizutani H, Tomiyama Y, Yonezawa T, Tarui S: Acid treatment of platelets as a simple procedure for distinguishing platelet specific antibodies from anti-HLA antibodies: Comparison with chloroquine treatment. *Vox Sang* 59: 106, 1990.
17. Giles CM, Botto M, King MJ. A study of HLA(Bg) on red cells and platelets by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Transfusion* 30: 126, 1990.
18. Braunstein NS, Germain RN, Loney K, Berkowitz N. Structurally interdependent and independent regions of allelic polymorphism in class II HLA molecules: Implications for Ia function and evolution. *J Immunol* 145: 1635, 1990.
19. Parham P, Lawlor DA, Salter RD, Lomen CE, Ennis PD. HLA- A,B,C: Patterns of polymorphism in peptide binding proteins. IN: B Dupont (ed): *The Immunology of HLA, Vol 2, Immunogenetics and Histocompatibility*. New York, Springer-Verlag, 1989, pp. 10.
20. Mc Cutcheon JA, Lutz CT. Amplified polymorphism in an HLA peptide binding pocket disrupts multiple antibody epitopes. *Human Immunol*, ASHI 16th Annual Meeting, pp 18, 1990 (Abstract).

