



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



HLA-G GENİNDEKİ 3'UTR POLİMORFİZMİNİN İNFERTİL KADINLARDA İNCELENMESİ

Pınar ATAKUL

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr.Türker DUMAN

2011- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HLA-G GENİNDEKİ 3'UTR POLİMORFİZMİNİN
İNFERTİL KADINLARDA İNCELENMESİ**

Pınar ATAKUL

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr.Türker DUMAN**

2011- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Diyagnostik İmmünoloji Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18 / 04 / 2011

Prof.Dr.Ümit ÖLMEZ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



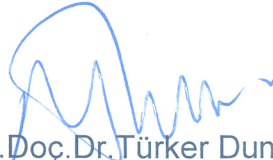
Prof.Dr.Nurşen Düzgün
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr.Hüseyin Tutkac
Ankara Üniversitesi



Doç.Dr.Murat Sönmezer
Ankara Üniversitesi



Yrd.Doç.Dr.Türker Duman
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. İnfertilite	2
1.1.1.1. Epidemiyoloji	2
1.1.1.2. İnfertilite Nedenleri	3
1.1.1.3. Etiyoloji	4
1.1.1.4. Açıklanamayan İnfertilite	5
1.1.2. İmmün Sistem	6
1.1.2.1. Gebelikte İmmünite	8
1.1.3. Gebelikte İmmün Tolerans	10
1.1.3.1. Semialojenik Fetüsü Maternal Graft Rejeksiyondan Koruma Stratejileri	10
1.2. HLA Sistemi	13
1.2.1. HLA-G Nedir	16
1.2.2. HLA-G Geni	16
1.2.3. HLA-G Fonksiyonu	18
1.2.3.1. HLA-G ve T Lenfositleri	19
1.2.3.2. HLA-G'nin B Lenfositleriyle Etkileşimi	20
1.2.3.3. HLA-G'nin NK Hücreleriyle Etkileşimi	20
1.2.3.4. HLA-G'nin Antijen Sunucu Hücrelerle Etkileşimi	21
1.2.4. HLA G Polimorfizmleri ve İnfertilite	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Moleküler Teknikler	23
2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
2.1.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	25
2.1.3. DNA Dizi Analizi	26
2.2. Çalışma Grubunun Oluşturulması	27
2.3. Yöntem	28
2.3.1. DNA İzolasyonu	28
2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	32
2.3.4. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	33
2.3.4.1. Poliakrilamid Jeli İçin Gümüş Boyama	34
2.3.5. DNA Dizi Analizi	35
2.3.6. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43

ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	54

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle tez çalışmamı planlamamda ve yürütmemde destek olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Türker Duman'a, master eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hüseyin Tutkak, Sayın Prof. Dr. Nurşen Düzgün, Sayın Prof. Dr. Ümit Ölmez ve Sayın Prof. Dr. Gülay Kınıklı hocalarıma; her zaman desteğini hissettiğim eşim Ümit Atakul'a; master eğitimim boyunca bana yardımcı olan arkadaşlarım Bio. Senem Koçak, Bio. Sena Şahin ve Bio. Mine Havan'a teşekkür ederim. Manevi desteğini her zaman üzerimde taşıdığım canım annem ve babama sonsuz teşekkürler.

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
3'UTR	3' untranslated region (transle olmayan bölge)
5'UR	5' upstream regulatory / promotor (promotor bölge)
A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
APC	Antigen-Presenting Cells (Antijen Sunucu Hücreler)
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (Sitotoksik T lenfositleri)
dATP	Deoksiadenintrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
ddH ₂ O	Didistile su
ddNTP	Dideoksinükleozidtrifosfat
dGTP	Deoksiguanintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dTTP	Deoksitimintrifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
G	Guanin
HLA-G	Human Leukocyte Antigen-G (İnsan Lökosit Antijeni-G)
HPA	Human Platelet Antigen (İnsan Trombosit Antijeni)
IFN- γ	İnterferon- γ
IL	İnterlökin
ILT	İmmünglobulin-Benzeri Transkript

IVF	İn Vitro Fertilizasyon
K ⁺	Potasyum iyonu
Mg ⁺⁺	Magnezyum iyonu
MHC	Major Histocompatibility Complex (Doku Uygunluk Kompleksi)
ml	Mililitre
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (Haberci Ribonükleik asit)
NK Hücreleri	Natural Killer Hücreleri (Doğal Öldürücü Hücreler)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RA	Romatoid Artrit
RBC	Eritrosit
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
Sn	Saniye
T	Timin
TBE	Tris Borik asit EDTA
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
Th	T–Helper (T-Yardımcı)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α (Tümör Nekroz Faktör-α)
Treg	Regülatuar T hücreleri
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1: Fetüsün maternal toleransı altında yatan çoklu mekanizmalar. Anneler, uterus içinde olan değişikliklerle ve embriyo/fetüsle, plasantanın özel adaptasyonlarıyla, fetüsün sonuna kadar güvenle kalacağı immun toleranslı bir çevrenin oluşmasına eşlik eder. NK hücreleri, doğal öldürücü hücreler; Treg, CD4+ regülatuar T hücreleri; TNF süper ailesi, tümör nekroz faktör süper ailesi. 12

Şekil 2: İnsan fetüsü, plasenta, ekstraplasental membranlar ve desidua olarak bilinen modifiye endometriyumun şematik örneği. Amniyotik kesede gelişen, fetüs plasenta ve koryon membran (kırmızı) içindeki trofoblast hücrelerince çevrelenmiştir. 13

Şekil 3: Klasik olmayan HLA sınıf Ib genleri (HLA-E, -F, -G) genleri, Ia (HLA-A, -B, -C) genleri gibi 6. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Ayrıca şekilde HLA sınıf 2 genleri (-DR, -DQ ve -DP) görülmektedir. HLA-G geni HLA-A genine yakın bir bölgede bulunmaktadır. 14

Şekil 4: Klas I MHC molekülü 15

Şekil 5: Klas II MHC molekülü 15

Şekil 6: HLA-G geni ve ifadelenmesi. HLA geni klasik HLA sınıf 1 genleri ile hemen hemen aynı yapıdadır. Ancak HLA-G'nin sitoplazmik kuyruğu daha kısadır ve kodlama bölgesinde daha fazla polimorfizm görülmektedir. HLA-G'nin 3' UT bölgesinde 14 baz çiftlik delesyon/insersiyon polimorfizmi bulunmaktadır. mRNA'nın alternatif uç birleştirmesi sonucu yedi HLA-G mRNA ve protein izoformları oluşur. Bunun dışında çözülebilir HLA-G izoformları bulunmaktadır. Bu çözülebilir izoformlar (HLA-G5, -G6, -G7) hücreler tarafından salgılanabilir. Daha kısa olan membran bağımlı izoformlar (HLA-G2, -G3, -G4) hücre yüzeyinde ifadelenirler. 18

Şekil 7: 14 bç lik delesyon polimorfizminin incelendiği poliakrilamid jel örneği. M: marker, 2, 5, 8, 9, 11, 12 numaralı kuyularda 210 bç lik bantlar görülmekte olup, 14 bç lik delesyonun mevcut olduğu örneklerdir. 7 numaralı kuyuda 224 baz çiftlik bant görülmekte olup, bu delesyonun görülmediği normal örnektir. 1, 3, 4, 6, 10, 13, 14 numaralı örnekler 224 ve 210 bç lik bantların her ikisini de göstermekte olup heterozigot örnekleri karakterize etmektedir. 35

Şekil 8: HLA-G geninin 14 bç lik insersiyonu içeren bölgesinin DNA dizi analizi ile çoğaltılmış örneği. 36

Şekil 9: HLA-G geninin 14 bç lik delesyonunu içeren bölgesinin DNA dizi analizi ile çoğaltılmış örneği. 37

ÇİZELGELER

Sayfa No

- Çizelge 1:** HLA G geninin PCR ile çoğaltılan 210 bç'lik bölümü görülmektedir. Primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızıyla işaretlenmiştir. 31
- Çizelge 2:** HLA-G geninin 3'UT 14 bazlık delesyonun (infertil hasta / fertil kontrol) grubundaki istatistiksel dağılımı. 39
- Çizelge 3:** HLA-G geninin 3'UT 14 bazlık delesyonun açıklanamayan (infertil hasta / fertil kontrol) grubundaki istatistiksel dağılımı. 40
- Çizelge 4:** HLA-G geninin 3'UT 14 bazlık delesyonun (infertil hasta - açıklanamayan infertil hasta / fertil kontrol) grubundaki istatistiksel dağılımı. 40

1. GİRİŞ

Çocuk sahibi olma evlilik kurumunun beklenen ve neredeyse kaçınılmaz sonucudur. Evli olan çiftlerin hemen hepsi çocuk sahibi olmayı planlamaktadır. A.B.D’de yapılan ulusal bir çalışmada kadınların % 2,8’i ve erkeklerin % 3,5’i çocuk sahibi olmayı planlamadıklarını bildirmişlerdir. İnfertilite bir yıl süreyle korunmaksızın cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen gebelik olmaması olarak tanımlanır. Üreme çağındaki çiftlerin % 10-15 infertildir.

Üreme biyolojisinde maternal immün sistemin gelişen fetüsü nasıl reddetmediği gizemini koruyan bir konudur. HLA-G, maternal-fetal toleransta rol oynayan bir HLA klas1 antijenidir. Çalışmalar HLA-G antijeninin insan preimplantasyon embriyosunda eksprese olabildiğini, immün düzenleyici rolü ile tolerojenik fonksiyonunun olduğunu ve implantasyonun kontrolünde rol oynadığını ortaya koymuştur.

HLA-G geninin 3'UTR (untranslated region= transle olmayan bölge) bölgesindeki 14 (bç) baz çiftlik delesyon-insersiyon polimorfizminin, HLA-G ifadenmesindeki değişiklikler ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bu polimorfizmin, HLA-G mRNA'sının alternatif uç birleştirmesi ve HLA-G düzeyindeki farklılıklarla ilişkili olduğu, ayrıca implantasyon ve gebelik süresince fetüs ve annenin HLA-G ifadenmesinin immün düzenleyici rolünü etkilediği düşünülmektedir (Hviid ve ark., 1999, 2003).

Bu çalışmada, HLA-G geni 3'UTR'deki delesyon/insersiyon polimorfizminin infertil kadınlarda, özellikle de açıklanamayan inferilite tanısı olan kadınlarda taranması amaçlanmıştır. Tez çalışması, bu polimorfizmin ülkemizdeki infertil ve sağlıklı kadınlardaki sıklıklarının belirlenmesini, hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasıyla HLA-G'nin ülkemizde kadın infertilitesine neden olan genetik faktörlerden biri olup olmadığının anlaşılmasını sağlayacaktır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İnfertilite

İnfertilite en az 1 yıl korunmasız düzenli cinsel ilişki (haftada iki gün) olmasına rağmen, gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanır (Kışnişçi HA ve ark.,1996). Bununla beraber tümüyle fertil popülasyonda yapılan bir çalışmada çiftlerin % 6,6'sının gebe kalmak için 2 yıla ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. İnfertilite üreyebilen yaş grubundaki (18-45) çiftlerin % 10-15 kadarını etkilemektedir. Son yıllarda bu oranın % 30 lara kadar çıktığı bilinmektedir. Normal ve sağlıklı çiftlerde 1 yıl içinde beklenen toplam gebelik oranı % 93 olup, yaş ilerledikçe fertilitede belirgin bir azalma meydana gelmektedir (Robinson GE ve ark, 1994). Ülkemizde 1,5-2 milyon çiftin kısır olduğu tahmin edilmektedir.

1.1.1.1. Epidemiyoloji

Fertiliteyi etkileyen başta yaş olmak üzere pek çok neden vardır. Yaşla birlikte overlerde folikül kalitesinde azalma, fertilize olan ovumun implantasyon şansında azalma, dolayısıyla fertilitede belirgin azalma meydana gelmektedir. 15-24 yaş arasındaki kadınların % 4'ünde azalmış fekonditeye (bir menstrüel siklus içerisinde gebe kalma oranı) rastlanırken, bu oran 25-34 yaş arasında % 13'dür. 40 yaşındaki kadınların % 33'ü, 45 yaşındakilerin ise % 87'si infertildir (Atherton F. ve ark, 1995). Yaşla birlikte kromozomal anomalilerinin sıklığı ve kendiliğinden düşük oranı artar.

Klinik olarak tanınabilen düşük oranı 30 yaşına kadar % 10 iken, 30 yaşların sonunda % 18'e, 40 yaşların başında ise % 34'e çıkar. Ayrıca 30'lu yaşlara girildiğinde endometriyozis, pelvik infeksiyon gibi fertiliteyi etkileyebilecek bir takım hastalıkların görülme ihtimali de artar. Çiftlerin doğurma yaşını bilerek geciktirmeleri, ilerleyen yaşla birlikte seksüel aktivitenin azalması da, dolaylı olarak yaş faktörü içine dahil edilebilir (Jaffe SB ve ark,1991; Menken J. ve ark.,1975; Westrom L ve ark.,1975).

Yaş ilerledikçe çevresel olumsuz faktörlere maruz kalma olasılığındaki artış fertilizasyonu da etkileyebilir (Stillman RJ ve ark,1986; Smith CG ve ark,1987).

Bazı bulgular son yıllarda infertilite oranlarında artma olduğunu göstermektedir. ABD’de 20-24 yaş grubundaki kadınlarda 1965’den beri infertilite oranında yaklaşık 3 kat artış bildirilmiştir (Robinson GE.ve ark.,1994-1997). Bu durum tanı yöntemlerindeki gelişmelerle infertilite tanısının ve nedenlerinin saptanmasının artmasına, potansiyel tedavi rejimlerinin ve sigorta kampanyalarının bu müdahalelerin bazılarında artan ödemelerinin çoğalmasına bağlanmıştır (Whiteford LM., ve ark ,1995).

Ayrıca evlilik yaşının ilerlemesi, dolayısıyla çocuk doğurma yaşının gecikmesi, intrauterin diyafram ve kontraseptiflerin kullanılması, cinsel yolla geçen hastalıkların artmasının da infertilitede etkileri olduğu düşünülmektedir (Robinson GE. ve ark, 1994-1997).

1.1.1.2. İnfertilite Nedenleri

Yapılan çalışmalar infertilitenin temelde kadınlardaki bozukluklardan kaynaklandığını göstermektedir.

Popülasyon temelli bir çalışmada aşağıdaki sonuçlar bildirilmiştir (Hull MG ve ark,1985).

- Erkek faktörü (hipogonadizm, post-testiküler defektler, seminifer tübüler disfonksiyon) — 26 %
- Ovulatuvar disfonksiyon — 21 %
- Tübüler hasar — 14 %

- Endometriyozis — 6 %
- Koital sorunlar— 6 %
- Servikal faktör — 3 %
- Açıklanamayan — 28 %

1.1.1.3. Etiyoloji

Kadına ait infertilite nedenleri arasında önemli yer tutan faktörlerden birisi, ovulatuvar ve luteal disfonksiyonlar olup, tüm infertilite sebepleri arasında % 15-20, kadın infertilitesi sebepleri arasında % 40 oranında gözlenmektedir (Speroff L. ve ark, 1999). Menstrüel siklusta yumurtlamayla sonuçlanan folikül gelişimi ve yumurtlama sonrasında gelişen luteal faz, birlikte ovulatuvar ve luteal faktörü oluşturur. Bu süreçte oluşabilecek bozukluklar döllenmiş ovumun implantasyonunu etkileyerek infertiliteye neden olabilir (Şahmay S.,1995).

Ovulatuvar faktörü oluşturan yumurtlama ve luteinizasyon ile ilgili gonadal seviyedeki muhtemel bozukluklar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- Luteal faz yetmezliği: Yumurtlama olması, fakat luteinizasyonun yetersiz olmasıdır. Yumurtlama sonrasında gelişen korpus luteum fonksiyonlarının yetersizliğini ifade eder. Korpus luteumun progesteron yapımının yetersizliği sonucunda, ya da endometriyumun cevapsızlığında oluşur. % 3-4 infertilite nedeni olabildiği gibi % 35 oranında da tekrarlayan düşüklere yol açan önemli bir faktördür. (Şahmay S.1995; Givens JR. ve ark, 1986).
- Anovulasyon: Kadında folikül gelişmemesi ya da gelişmesinde bozukluk olması sonucunda yumurtlamanın olmamasıdır. Obezite, ağır egzersiz, duygusal durum, hipofiz ve over kaynaklı (özellikle polikistik over) nedenler

ayrıca tiroid, sürrenal, hepatorenal nedenler anovulasyona sebep olabilir. Bazen anovulasyona sebep olan bir neden bulunmaz, bu grup yumurtlamanın uyarılmasına iyi sonuç verir (Şahmay S.,1995; Givens JR. ve ark.,1986).

Tubaperitoneal faktörler infertilite etyolojisinde % 35-40 oranında yer tutar (Speroff L. ve ark.,1999) . Sebepleri şu şekilde sıralayabiliriz:

- Pelvisin inflamatuvar hastalıkları
- Endometriyozis
- Abdominopelvik operasyonlar

Uterusa ait faktörlerin görülme sıklığı % 2-5 arasındadır (Jelewicz R ve ark, 1995) . Konjenital olabildiği gibi sonradan da meydana gelen bu patolojiler şöyle sıralanabilir: Miyomlar ve endometrial polipler, rahim içi yapışıklıklar, endometritler, müllerian anomaliler.

Servikal faktörler, infertil olguların % 5-10'undan sorumludur. Mukusta meydana gelen kalite, kantite, enfeksiyon ve immunolojik değişikliklerdir (Jelewicz R ve ark,1995).

1.1.1.4. Açıklanamayan İnfertilite

Gebelik oluşabilmesi için gerekli aşamalardan herhangi birinde ortaya çıkan bir engel sonucunda ortaya çıkan infertilitenin tetkikinde her iki cinse yönelik ileri tetkikler kullanılmakta ve bunların sonucunda sebep bulunamayan olgular açıklanamayan infertilite olarak adlandırılmaktadır (Çolgar U. ve ark.,1995).

1.1.2. İmmün Sistem

İmmünite, organizmanın başta mikroorganizmalar olmak üzere her türlü yabancı maddeye karşı verdiği yanıtı tanımlamak üzere kullanılır. İmmüniteden sorumlu hücre ve moleküller immün sistemi oluşturur.

Geleneksel olarak immün sistem farklı fonksiyonlara sahip 2 gruba ayrılarak incelenir:

- Doğal İmmünite
- Adaptif (Kazanılmış) İmmünite

Doğal İmmünite: Bireyi, potansiyel olarak tehlikeli ajanlardan koruyan ve çoğu bu ajanlarla karşılaşmadan önce de organizmada zaten bulunan koruyucu mekanizmalar doğal immüniteyi oluşturur. Doğal immünite elemanları mikroorganizmalara karşı ilk basamak savunmayı yaparlar ve bazı hallerde mikroorganizmanın ortadan kaldırılmasında tek başlarına yeterli olabilirler. Deri ve mukoz membranların oluşturduğu fiziksel engel, epitelyum yüzeylerdeki antimikrobiyal maddeler (defensinler, kriptosidinler), kan ve dokulardaki fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller), doğal öldürücü hücreler (naturel killer, NK) ve akut faz proteinleri (CRP) ve kompleman sistemi gibi bazı plazma proteinleri doğal immünitenin başlıca elemanlarını oluşturur. Doğal immünite sadece farklı sınıf mikroorganizmaları ayırabilmektedir, çeşitliliği sınırlıdır, hafızası yoktur. Buna karşılık biçim tanıyan reseptörleri taşıyan hücrelerin efektör fonksiyonlarını göstermek için çoğalmaları gerekmediğinden, etkinliklerini çok çabuk gösterirler. Doğal immün sistem, adaptif immün sistemin reseptör sayısı ve çeşitliliğiyle karşılaştırıldığında, ileri derecede sınırlı sayıdaki reseptörleriyle mikroorganizmalara ait belirli yapıları tanıyıp kostimulatörler, sitokinler ve kemokinlerin yapımını indükleyerek antijen spesifik lenfositlerin uyarılmasını ve adaptif immün yanıtın başlamasını sağlar. Böylece doğal immün sistem bir şekilde kendi ile kendi olmayanı tanıyarak kendi

organizmasına zarar vermediği gibi daha sonra gelişecek adaptif immün yanıt tipinde de belirleyici olabilir.

Adaptif İmmünite: Bir yabancı ajan ile karşılaşıldığında uyarılan ve sadece o antijene özgü olarak gelişen ve o antijenle bir kez daha karşılaşıldığında daha güçlü olarak yanıt verilmesini sağlayan sistemdir. Adaptif immünitede çok çeşitli hücre ve molekülleri birlikte çalışırlar. Adaptif immünitenin başlıca elemanları T ve B lenfositler, antikorlar ve bazı sitokinlerdir. Antijen sunan hücrelerin de çok önemli rolü vardır.

Adaptif immün yanıtlar doğal immün yanıtı takip eder. Adaptif immünite, doğal immünitenin koruyucu mekanizmalarını güçlendirir, bu mekanizmaları antijenin giriş yerine yönlendirerek yabancı antijenin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır.

Adaptif immün yanıtlar, sekonder lenfoid dokular olarak adlandırılan lenf nodları, dalak ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokularda gelişir. Bu tür yanıtlar, cevabı oluşturan immün sistem elemanlarına göre hüморal ve hücreyel diye iki grupta incelenirler ve farklı mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasında işlev görürler.

Hüморal İmmünite: Burada antijeni spesifik olarak tanıyan ve çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırılmasını sağlayan moleküller olan antikorlar başlıca rolü oynar. Antikorlar, spesifik antijeni ile karşılaşmış B lenfositlerden farklılaşan plazma hücreleri tarafından yapılan immünoglobulinlerdir. Antikorlar dolaşımdaki ekstra-sellüler mikroorganizmalar ve toksinlerine bağlanıp ortadan kaldırılmalarını yönlendirirler. Buna karşılık dolaşan antikorlar virüsler, mantarlar ve bazı bakteriler gibi hücreiçi yerleşim gösteren mikroorganizmalara ulaşamazlar. Bunlara karşı savunmada, mikroorganizmaların aktif makrofajlarca fagosite edilerek ortadan kaldırılmasını ya da infekte hücrenin lizisini sağlayan hücreyel immünite başlıca rolü oynar. Normal, sağlıklı bir yetişkinin serumunda sayılamayacak kadar farklı tipte antikor molekülü bulunur.

Hücresel İmmünite: Burada antijeni spesifik olarak tanıyan T lenfositler başlıca rolü oynarlar. T lenfositler antijeni ancak ASH (Antijen Sunan Hücre)'ler ya da hedef hücre üzerindeki MHC molekülleri ile birlikte sunulduğunda tanırılar. Yüzeylerinde CD4 molekülü taşıyan yardımcı T lenfositler (Th) Klas II MHC tarafından sunulan antijenleri tanıyabildikleri için bu olaya Klas II MHC'ye bağımlı ya da Klas II MHC ile sınırlı denir. Yüzeylerinde CD8 molekülü taşıyan sitotoksik T lenfositler (Tc veya CTL) ise MHC Klas I'e bağımlıdır.

Th hücrelerinin alt tipleri: Th1, Th2, Th17, Treg hücreleridir. Th1 ve Th2 farklı sitokinleri salgılayarak birbirlerinin etkilerini dengelerler. Somatik hücrelerin hemen hepsinde Klas I MHC molekülleri mevcutken, Klas II MHC molekülleri başlıca profesyonel antijen sunan hücreler (dendritik hücreler, aktif makrofajlar ve B lenfositler) olmak üzere nispeten kısıtlı sayıda hücrede bulunur. Dendritik hücreler deride ve mukozal yüzeyin altında bulunduklarında Langerhans hücreleri olarak adlandırılırlar. Karaciğerdeki Kupffer hücreleri, santral sinir sistemindeki mikrogliyal hücreler ve kemikteki osteoklastlar belli özellikleri olan doku makrofajlardır (Delves PJ. ve ark., 2000; Abbas AK ve ark., 2000).

1.1.2.1. Gebelikte İmmünite

Gebe, gebelik boyunca T hücrelerine bağımlı bilinen mekanizmalar açısından immün defekt göstermez ve gebelik boyunca immün kompetan kalır. Ancak gebelikte maternal immün cevaplar yine de bazı değişikliklere uğrar. IL-2 oluşturan Th1 sitokin profili gebelik süresince baskılanır ve profil Th2 yönüne kayar. Th1 cevabı fetal allograftın rejeksiyonunu provoke eder; bu nedenle Th2 hücre etkisi altında gebelik boyunca baskılanır. Gebe kadında Th1/Th2 sitokin oranı belirgin biçimde düşüktür ve bu doğumdan sonra da bir süre devam eder. Desidual Th1 hücrelerinin azalması, Fas-Fas Ligand aracılığı ile oluşan apoptozdan ileri gelebilir. Th2 dominansı özellikle feto-plasental çevrede belirgindir. Feto-plasental ünitinden alınan supernatantlarda, Th2 ürünü olan artmış IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-3 düzeyleri saptanır. Th1 ürünü olan IFN- γ ifadenmesi geçici olarak baskılanmıştır. Gebelikte nötrofil aktivitesi de belirgin olarak azalmış bulunur. Th2 dominansına uygun olarak

maternal immün cevap, hücresel immüniteden uzaklaşır ve antikor yapımına doğru kayar. Gebelik süresince RA (Romatoid Artrit) geçici remisyona girer. Buna karşılık aşırı otoantikor yapımı ile birlikte olduğu bilinen SLE (Sistemik Lupus Eritematozus) alevlenmeler gösterebilir (Forsthuber T ve ark,1996; Moncayo H ve ark,1994; Reinhard G ve ark, 1998; Strirrat GM ve ark, 1994; Wegmann TG ve ark, 1993).

Gebelerde maternal-fetal karşılıklı yüzeylerde Th2 sitokin yapımının artmış bulunması, fetal yaşam bakımından önemlidir ve muhtemelen, immünolojik toleransı korumaya yönelik bir durumu ifade eder. NK aktivitesi gebede azalmıştır. Farelerde, IFN- γ ile NK aktivitesinin indüklenmesi fetal rezorbsiyona yol açar. Uteroplasental TNF- α yapımı gebelik süresince artsa bile, sitokin, sinsisyotrofoblastlar tarafından sentezlenen     nebilir TNF- α reseptörleri ile nötralize edilir. Gebelerde CD4+ T hücrelerinin azaldığı, baskılayıcı CD8+ T hücrelerinin arttığı ve B hücre imm nitesinin değişmediği bildirilmiştir (Lin H ve ark.,1993; Sarzotti M ve ark.,1996; Watanabe M ve ark., 1997)

Gebelik süresince yukarıda özetlenen bu değişmelerin, hücre-içi patojenler (bazı virüsler, T.gondii, M.tuberculosis, L.monocytogenes) lehine bir durum yarattığı düşünülebilir. Ancak gebelik sırasında anne ve fetüs arasındaki karşılıklı immünolojik etkileşimler, maternal lenfositlere fetal antijen sunumunun olmamasından veya maternal lenfosit fonksiyonlarının, maksatlı olarak baskılanmış tutulmasından dolayı sadece baskılanmıştır. Gebe kadın, enfeksiyona belirgin biçimde duyarlı olmasa bile gebelik, kazanılmış (adaptif) immünitenin aktif olarak baskılandığı dönem olarak dikkate alınmalıdır. Bununla birlikte, bu baskılanma, maternal doğal immünitenin aktivasyonu ile dengelenir. Gebelikte granülositlerin, monosit/makrofajların sayıları ve fonksiyonları artmış bulunur. Buna karşılık NK hücrelerinin sayısı, sitotoksik kapasiteleri ve IFN- γ sentez kapasiteleri azalmıştır. Kompleman sisteminin komponentleri ve akut faz proteinleri de gebelik süresince artmıştır. Dolayısıyla gebelikte fetüsün güvenliğini sağlayan selektif immünolojik değişmelerin, bir immün yetmezlik gibi değerlendirilmesi doğru değildir. Doğal immünitenin gebelik sırasında aşırı düzeyde aktif olması, anne yönünden (bazı

enfeksiyonların ağırlığında artış, pre-eklampsi) ve fetüs yönünden (düşük riski) zararlı olabilir. İnsanda maternal enfeksiyonlarda pro-inflamatuvar sitokin yapımı doğum sancılarını başlatarak erken doğumu indükleyebilir (Crouch SPM ve ark., 1995; Reid MST ve ark., 1998; Sacks G ve ark.,1999; Wilson CB ve ark.,1986).

1.1.3. Gebelikte İmmün Tolerans

İnsan gebeliğinin başarısı, fetüsün maternal uterusunda dokuz ay boyunca reddedilmeden kalabilmesi, immünolojinin ilkelerine karşı gelir (Hunt J.S ve ark., 2005).

Medawar, gebelikte fetüsün maternal rejeksiyonunu engellemedeki stratejileri ilk olarak tartışmıştır (Medawar P. B.,1953). Önerilen mekanizmalar maternal ve fetal dokuların fiziksel ayrımı, graft reddini tetikleyecek fetal antijenlerin yokluğu ve toleransın gelişmesini içerir.

1.1.3.1. Semialojenik Fetüsü Maternal Graft Rejeksiyondan Koruma Stratejileri

Gebelik sırasında, maternal immün sistem aktiftir, bazı durumlarda fetusa zarar verebilir. Tanımlanmış patolojik olaylar; fetal eritrositlerin (Rh antijen, eritroblastozis) ve trombositlerin (HPA-1 ve -2, alloimmün trombositopeni) maternal antikolar ve gebelik enfeksiyonlarıyla aktive edilmiş makrofajların yüksek seviyede Th-1 tip sitokinleri salgılamasıyla değişmesini içerir (Hunt ve ark,1989; Marzi, M. ve ark, 1996).

Maternal immün sistem kanıtlanabilir biçimde aktif olmasına rağmen, annelerin genellikle genetik olarak kendinden kısmen farklı olan fetüsleri reddetmek yerine, tolere ettikleri görülür. Normal olarak annenin fetal hücrelerce eksprese edilen yabancı (paternal) HLA ve diğer antijenlere karşı graft saldırgan antikolar ve sitotoksik T lenfositler (CTL) üretmesi beklenir.

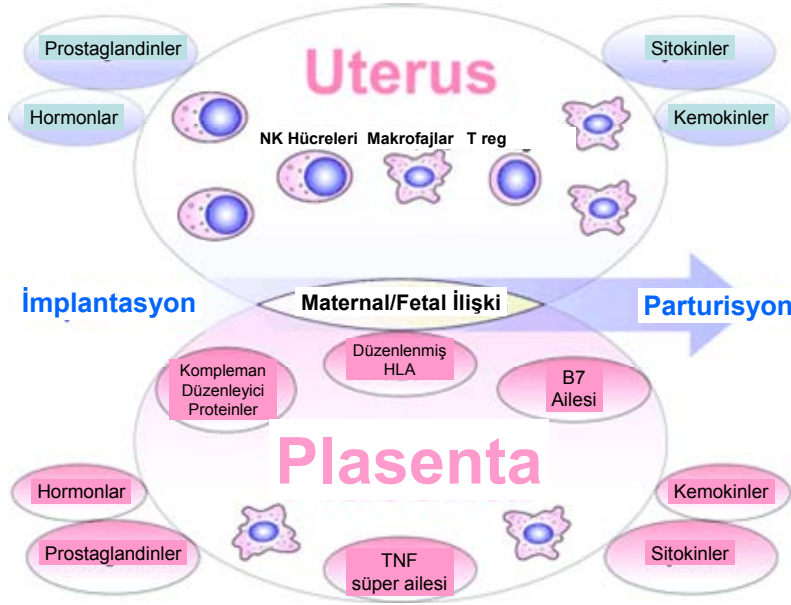
Ebeveynlerin HLA antijenlerinde hemen hemen tamamen farklı olmasına karşı, fetüsün rejeksiyonunda paternal HLA'nın maternal olarak algılanması sonucu, yeterince açıklanamamıştır. Gebe kadında, anti-paternal HLA antikorları olmasına rağmen, fetüse zarar vermez. Hatta fetal membranlarda eksprese olan asıl HLA antijenleri immünojenikten daha çok tolerojeniktir (Hunt J. ve ark., 2003).

Maternal CTL tarafından atak, aşağıda açıklandığı gibi efektif olarak engellenir. Sonuçta, maternal toleransın altında yatan mekanizmalar beklenmedik şekilde etkilidir ve embriyo/fetüsün canlılığını garantilemek için nasıl immün toleransın gebeliğin doğal durumunda sağlandığı kritik sorusunu ortaya çıkartır.

Maternal ve fetal işlemlerin prensiplerinin güvenli bir çevre üretmesine katkıda bulunmasını örnekleyebiliriz (Şekil 1). Uterus içinde, implantasyon sonucunda endometrial lökosit alt gruplarında ciddi bir değişiklik olur. Değiştirilmiş endometriyum (şimdi desidua olarak ifade edilir) lokal korumanın doğal bağışıklık sistemiyle yavaş yavaş bir şekile dönüşür. Bu noktadan ileriye doğru, kazanılmış bağışıklığın ana oyuncularını, T ve B lenfositler, fetal dokuların uzağındaki miyometriyum içinde; diğer yandan da doğal immün sistemin üyeleri olan doğal öldürücü hücreler (NK) ve makrofajlar desidua'da baskındır (Givan A. L. ve ark., 1997; Bulmer J. N. ve ark, 1988).

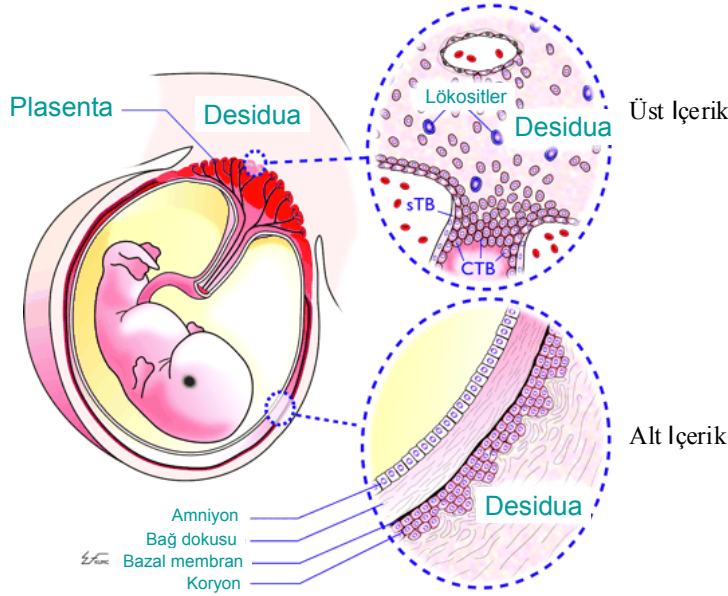
Bir istisna olarak CD4+/CD25+ hücrelerinin Treg alt grubu, IL-10 (İnterlökin-10) ve TGF-β1(Transforming Growth Faktör- β1) üretir ve bu üretimin toleransı sağlamada önemli olduğu bilinir (Sakaguchi S, 2000; Read S.ve ark, 2001).

Bu hücrelerin erken desidua'da proliferasyonu östrojenle uyarılır (Polanczyk M. J. ve ark., 2004).



Şekil 1: Fetüsün maternal toleransı altında yatan çoklu mekanizmalar. Anneler, uterus içinde olan değişikliklerle ve embriyo/fetüsle, plasantanın özel adaptasyonlarıyla, fetüsün sonuna kadar güvenle kalacağı immun toleranslı bir çevrenin oluşmasına eşlik eder. NK hücreleri, doğal öldürücü hücreler; Treg, CD4+ regülatur T hücreleri; TNF süper ailesi, tümör nekroz faktör süper ailesi.

Fetüs, blastokistin trophoctoderm katmanından ortaya çıkan, trofoblast hücrelerinden oluşmuş, blastokistin iç hücre kümesinden türemiş, koruyucu bir kabuk içerisinde izole edilmiştir (Şekil.2). Bu durum, trofoblast hücrelerinin ağır sorumluluğuna uygun olarak maternal çevreyle etkileşimini ve fetüsün maternal immün ataklara karşı korunmasını sağlar. Trofoblast hücreleri antikor-bağımlı zararı, yüksek seviyelerde kompleman düzenleyici proteinler göstererek (Hsi B. L. ve ark, 1991), inhibitör üyelerinden B7 ailesi (Petroff M. G. ve ark, 2003) ifadenmesiyle hücre-aracılı immüniteyi azaltarak ve apoptoz- baskılayıcı üyelerden TNF (tümör nekroz faktör) ligandları ailesiyle(Chen, H. L. ve ark, 1991) atlatır (Şekil.1). Desidua'daki hücreler ile fetal hücreler immün baskılayıcı sitokinleri, kemokinleri ve T lenfosit proliferasyonunu azaltan prostoglandinleri ve progesteron gibi yüksek seviyelerdeki immün baskılayıcı hormonları üretir.



Şekil 2: İnsan fetüsü, plasenta, ekstraplasental membranlar ve desidua olarak bilinen modifiye endometriyumun şematik örneği. Amniyotik kesede gelişen, fetüs plasenta ve koryon membran (kırmızı) içindeki trofoblast hücrelerince çevrelenmiştir.

Üst içerik: Plasental villideki sitotrofoblast (CTB) hücreler, tüm farklılaşmış trofoblast hücre popülasyonlarının ata hücreleri olarak etki eder, sürekli maternal kana maruz kalan sinsityotrofoblast(sTB) tabakasını içerir. Bu tek hücre katmanı maternal-fetal besin ve atıkların transferinden, plasental hormonların sentezinden ve maternal hücre trafiğinde fetüse fiziksel bariyer sağlanmasından sorumludur. CTB hücreleri hızla çoğalır ve desidua içine göç eder, plasentaya tutunur ve başarılı gebelik için gerekli mutlak önemli fizyolojik olaylara yardımcı olur.

Alt içerik: Tek katman epitel hücrelerden oluşan amniyotik membran, amniyotik sıvıda fetüsü tutan güçlü bir kesedir. Koryon membran CTB hücreleri, ekstravillous CTB hücrelerinin göçüyle türemiş, maternal desidua hücreleriyle direk olarak kesişir.

1.2. HLA Sistemi

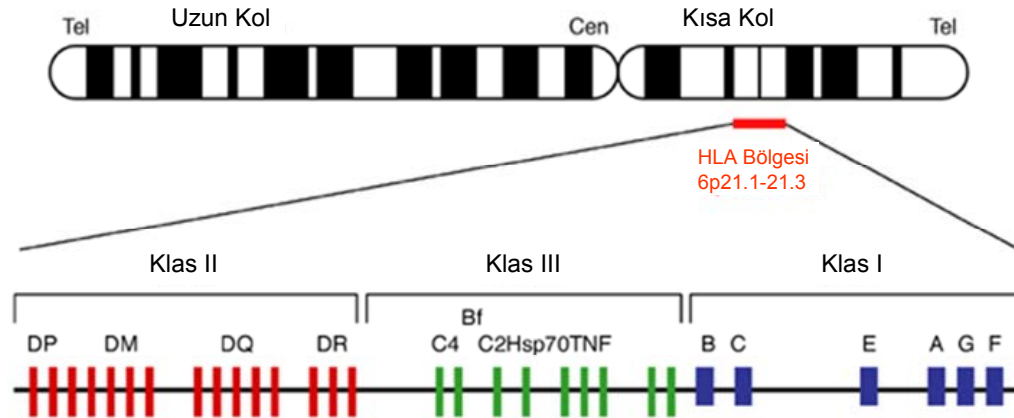
İmmün sistemin başlıca görevi, organizmayı yabancı moleküllere ve mikroorganizmalara karşı savunmada onları tanımak ve çeşitli efektör

mekanizmalarla cevap vermektir. İmmün tanımda yabancı antijenleri self olanlardan ayırt etme görevi başlıca MHC (Major Histocompatibility Complex) molekülleri yani doku uygunluk antijenleri ile gerçekleşir. Hücre yüzeyinde bulunan MHC molekülleri yabancı antijenleri bağlar ve immün sistemin effektör hücrelerine sunarak immün cevabın başlamasında anahtar rol oynar. MHC molekülleri yüksek derecede immünojenik olduklarından transplantasyonda alıcı ve verici arasında farklı MHC molekülleri yabancı antijen olarak fark edilir ve immün cevabı uyatarak rejeksiyon mekanizmalarını başlatır. Bu nedenle MHC molekülleri transplantasyon antijenleri olarak da bilinirler. MHC yerine HLA (Human Leucocyte Antigen) terimi de kullanılır.

İnsanlardaki MHC veya HLA, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde 4Mb büyüklüğünde olup 130 fonksiyonel geni vardır. Bunlardan en iyi tanımlananları klasik HLA la ve 2 genleridir (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ ve —DP) (MHC sekans konsorsiyumu, 1999) (Şekil.3). Bunlar, organ transplantasyonu, antijen-peptid tanınması ve otoimmün hastalıklar ile ilgileri bakımından iyi bilinen tipleridir.

1980'lerin sonlarından itibaren klasik olmayan HLA sınıf Ib genleri de gündem oluşturmaya başlamıştır (Geraghty ve ark., 1987).

Kromozom 6



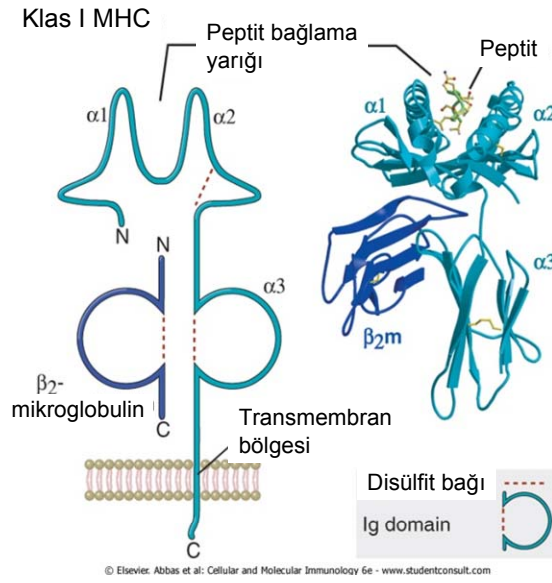
HLA (Human Leukocyte Antigen) bölgesi Gen haritası

Expert Reviews in Molecular Medicine©2003 Cambridge University Press

Şekil 3: Klasik olmayan HLA sınıf Ib genleri (HLA-E, -F, -G) genleri, Ia (HLA-A, -B, -C) genleri gibi 6. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur. Ayrıca şekilde

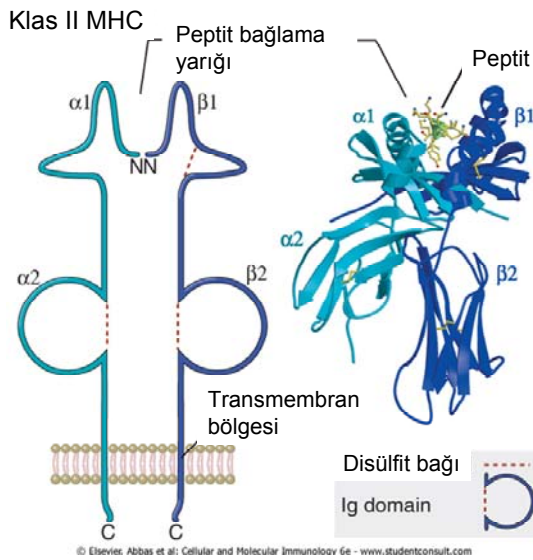
HLA sınıf 2 genleri (-DR, -DQ ve -DP) görülmektedir. HLA-G geni HLA-A genine yakın bir bölgede bulunmaktadır.

Klas I molekülleri, üç alfa (α -1, α -2 ve α -3) polipeptidi ve beta-2 mikroglobulinden (β 2-m) oluşmaktadır. Antijen bağlayan bölge α -1 ve α -2 arasında yer alır (Şekil.4).



Şekil 4: Klas I MHC molekülü

Klas II molekülleri birbirine non-kovalent bağlarla bağlanmış iki polipeptit zincirinden (α ve β) oluşur, antijen bağlayan bölge, α -1 ve β -1 arasında yer alır (Şekil 5).



Şekil 5: Klas II MHC molekülü

İmmün sistemin antijeni tanınmasında Klas I ve Klas II MHC moleküllerinin önemli rolü vardır. Endojen antijenler örneğin virüs ile enfekte hücrede oluşan viral peptit Klas I molekülüne bağlanarak hücre yüzeyinde eksprese olur ve CD8+ T hücreler bu peptidi tanır. Daha sonra immün yanıtın diğer aşamaları gerçekleşerek virüs ile enfekte hücre öldürülür. Ekzojen antijenler MHC Klas II molekülüne bağlandığında CD4+ T hücreler tarafından tanınarak bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile immün yanıt gerçekleşir.

1.2.1. HLA-G Nedir

HLA-G, sitotrofoblast hücreleri üzerinde maternal-fetal kesişimle seçici olarak eksprese olan, klasik olmayan bir HLA Klas 1 molekülüdür. HLA-G ilk olarak, uterin NK hücreleri üzerinde olan inhibitör reseptörlerinin ligandı olarak tanımlanmış ve böylece maternal-fetal toleransa katkı sağladığı gösterilmiştir. (Rouas-Freiss N. ve ark., 1997). HLA-G diğer HLA Klas 1 moleküllerinden;

- Limitli polimorfizm (Morales ve ark., 1993; Le Discorde ve ark., 2002),
- Yetişkin ve embriyonik insan dokusunda sınırlı bir ifadenme paterni,
- Alternatif birleştirme ile oluşan 7 protein izoformunun özel ifadenme paterniyle,
- İmmün toleransa sebep olan biyolojik özellikleriyle farklılık gösterir.

1.2.2. HLA-G Geni

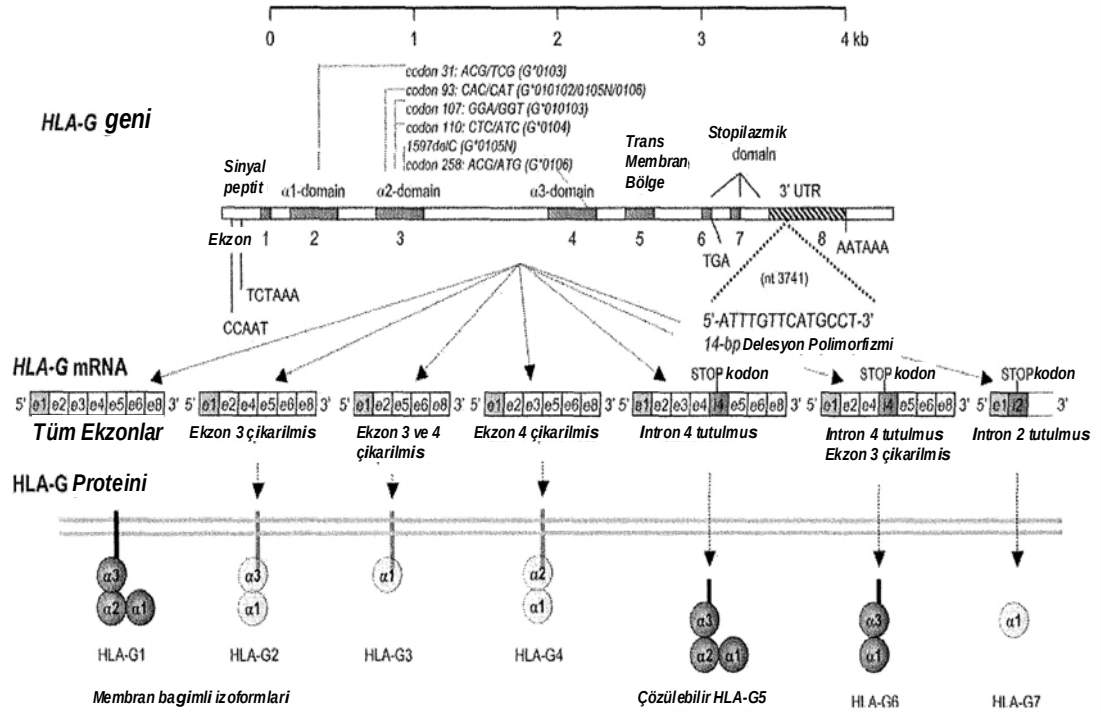
Sağlıklı bireylerde, HLA-G gen transkripsiyonu temel seviyede birçok doku ve organda gözlenir. Buna rağmen, HLA-G proteinlerine translasyon trofoblast, timus, kornea, tırnak matrixi, pankreas ve eritroid ve endotel prekürsörlerle sınırlıdır. Buna ek olarak, HLA-G proteinleri organ transplantasyonu, malignant transformasyonlar,

viral enfeksiyonlar ve inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar sonrası bulunur (Carosella E.D. ve ark.,2003).

HLA-G'nin genomik yapısı diğer sınıf 1 genlerine benzemesine rağmen pek çok bakımdan farklı özellikleri vardır. HLA-G geninin sekiz ekzonu vardır (Şekil 6). Ekzon 1 sinyal peptid olup (endoplazmik retikuluma girince atılır) al, a2 ve a3 (sırasıyla; ekzon 2, ekzon 3, ekzon 4) transmembran bölgedir. HLA-G'nin a3 bölümü, sitotoksik T lenfositlerindeki CD8 glikoproteinleri ile etkileşim halindedir. Beşinci ekzon hidrofobik transmembran kısmını kodlar. HLA-G klasik HLA sınıf 1 moleküllerinden altıncı ekzondaki dur kodonuyla farklılık gösterir. Dur kodonundan dolayı sitoplazmik kısmın büyük bir bölümü translasyona uğramaz. 30 aminoasidin transle olması gerekirken 6 aminoasit translasyona uğrar ki; bu eksik translasyon HLA-G sitoplazmik kuyruğunun fosforilasyon bölgesi olan serin birimini ve tirozin kinazın substratı olan tirozin birimini kaybetmesine neden olur (Bouteiller ve Mallet, 1997). Bu durum hücre yüzeyinde HLA-G'nin uzun sürede eksprese olmasına ve döngüsünün yavaş olmasına neden olmaktadır. Ekzon 5 ve intraselüler bölgeyi oluşturan ekzon 6 ve ekzon 7 diğer klas 1 genleri ile benzerdir (Hunt J ve ark., 2005).

HLA-G molekülleri immün sistemin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta olup genin primer transkriptinin alternatif uç birleştirmesi sonucu 7 adet protein izoformu oluşmaktadır. HLA'nın G1'den G4'e kadar olan mRNA formları membran bağımlı molekülleri(HLA-G1,HLA-G2,HLA-G3,HLA-G4), G5'ten G7'ye kadar olanlar ise çözülebilir molekülleri (HLA-G5,HLA-G6,HLA-G7) kodlamaktadır (Ishitani ve ark., 1992;Fuji ve ark., 1994;Kirszenbaum ve ark., 1994). HLA-G4 ve HLA-G7 izoformları plasentada çok bulunmamaktadır (Carosella, 2000).

Yakın zamanda yayınlanmış veriler, HLA-G ifadenmesinin hücreyi NK hücre lizisine karşı koruduğunu ileri sürer (Rajagopalan ve ark, 1999;Marchal-Bras ve ark, 2001;Riteau ve ark,2001). Ayrıca in vitro veriler HLA-G Th1 sitokinleri, IFN γ ve TNF- α 'yı PBMC ve desidual mononükleer hücrelerden downregüle ettiğinin kanıtını gösterir.



(Hviid T V F Hum. Reprod. Update 2006;12:209-232)

Şekil 6: HLA-G geni ve ifadenmesi. HLA geni klasik HLA sınıf 1 genleri ile hemen hemen aynı yapıdadır. Ancak HLA-G'nin sitoplazmik kuyruğu daha kısadır ve kodlama bölgesinde daha fazla polimorfizm görülmektedir. HLA-G'nin 3' UT bölgesinde 14 baz çiftlik delesyon/insersiyon polimorfizmi bulunmaktadır. mRNA'nın alternatif uç birleştirmesi sonucu yedi HLA-G mRNA ve protein izoformları oluşur. Bunun dışında çözülebilir HLA-G izoformları bulunmaktadır. Bu çözülebilir izoformlar (HLA-G5, -G6, -G7) hücreler tarafından salgılanabilir. Daha kısa olan membran bağımlı izoformlar (HLA-G2, -G3, -G4) hücre yüzeyinde ifadenirler.

1.2.3. HLA-G Fonksiyonu

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, fonksiyon görmeyen evrimsel bir artık olarak nitelendirilen HLA-G'nin (Parham, 1996) immün hücreleri düzenleyen ve böylece gebelik uterusundaki immün ayrıcalığı kuran bir unsur olduğunu ortaya koymuştur.

Ayrıca, solid tümörlerde (Paul ve ark., 1998; Wiendl ve ark.,2002) viral enfekte hücrelerde (Onno ve ark.,2000; L'ozano ve ark.,2002), transplante edilmiş organlarda (Lila ve ark.,2002;Creput ve ark.,2003), kutanöz inflamatuvar hastalıklarda (Khosrotehrani ve ark., 2001) ve yakında Multiple Skleroz hastalarının serebral spinal sıvısında (Fainardi ve ark.,2003) raporlanan HLA-G molekül ifadenmesinin her iki membran ve çözünabilir HLA-G antijenleri için doku dağılımının genişlemesi, HLA-G moleküllerinin genel tolerojenik fonksiyonunu desteklemektedir.

1.2.3.1. HLA-G ve T Lenfositleri

İn vitro çalışmaları, çözünabilir ve membran- bağımlı HLA-G'nin, insan allojenik periferik kan mononükleer hücrelerinden (Kanai, T. ve ark, 2001) sitokin salınımını değiştirme kabiliyetinin, allojenik CTL cevabının (Kapasi K ve ark.,2000) oluşmasında konsantrasyona bağlı bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Kazanılmış immün cevabın başlamasına ilişkin (LeMaoult J. ve ark., 2004) başka bir çalışma, HLA-G1 ile transfekte APC'nin CD4+T hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini ve onları immün-baskılayıcı fenotipe yönlendirdiğini göstermiştir.

Membran-bağımlı ve çözünabilir HLA-G, CD8+ T hücrelerinin gebelikteki regülasyonunda alloreaktif (anti-paternal) T hücrelerinin eliminasyonu ile kritik bir rol oynayabilir. İki birbirinden bağımsız çalışma grubu, HLA-G'nin CD8+ T hücre apoptozunu başlattığını raporlamıştır (Contini P. ve ark., 2003; Fournel S. ve ark., 2000; Solier C. ve ark., 2002). Çözünabilir HLA-G maternal serumda birçok grup tarafından (Rebmann V. ve ark., 1999; Hunt J. S. ve ark.,2000) saptanmıştır. Gebelikte çözünabilir HLA-G'nin, paternal antijenlerle etkileşen CD8+ hücrelerin apoptozunu indüklemiş olabileceği düşünülmektedir

HLA-G'nin T hücreler üzerindeki etkisini düşünürken, iki noktayı hatırlamak önemlidir.

- T hücreleri desidua'da (Bulmer, J. N. ve ark,1988) çok fazla değildir.

- Normal, sağlıklı plasentalardaki trofoblast hücreler bir CTL hücre cevabı oluşturmazlar.

1.2.3.2. HLA-G'nin B Lenfositleriyle Etkileşimi

İmmünglobulin benzeri transkriptler, T lenfositler ve APC'ler üzerindeki HLA-G ile etkileşimi olan ana reseptörler olarak görülür. Bunlar aynı zamanda B lenfositleri üzerinde de vardır, ILT2 inhibitör reseptörlerini eksprese eder (Colonna M ve ark.,1997). HLA-G'nin B hücreleri üzerindeki bu reseptörlere bağlandığına ya da B hücrelerinin direkt olarak HLA-G'ye yanıt verdiğine dair şu ana kadar hiçbir kanıt yoktur.

1.2.3.3. HLA-G'nin NK Hücreleriyle Etkileşimi

NK hücrelerinin CD16-CD56+(parlak) genel olmayan fenotipi, ilk ve ikinci trimestr'daki desidua'da çoktur, daha sonra sayısı azalır (Bulmer, J. N. ve ark.,1988). Bu hücreler genel NK hedeflerine karşı zayıf öldürücüdür, gebe uterusundaki çevresel ortamın onların fonksiyonunu etkilediği tahmin edilir. İlk olarak transfeksiyon bazlı deneyler HLA-G ve NK hücrelerinin yüzeyindeki CD94/NKG2A heterodimerinin etkileşiminin, NK hücrelerince indüklenen sitolizi engellediği ileri sürülmüştür (Perez-Villar J. J. ve ark., 1997; Soderstrom K. ve ark.,1997; Pende D. ve ark., 1997) .İlk buluşlar HLA-G'nin NK-aracılı sitolizi CD94/NKG2A ile azaltmakla sorumlu olduğu yanlış sonucuna götürmüş, gerçekte HLA-G ifadenmesinin sadece bu inhibitör reseptör için doğru bir ligand olan HLA-E'nin ifadenmesine izin verdiği anlaşılmıştır (Lee N. ve ark., 1998)

Yeni bilgiler, maternal-fetal arayüzde HLA-G/NK hücre etkileşiminin potansiyel rolünü su üstüne çıkarmıştır. KIR2DL4 ligasyonu ve NK hücrelerinin HLA-G ile muamelesi sitokin İnterferon- γ (IFN- γ) üretimiyle sonuçlanmıştır (Rajagopalan S. ve ark., 2001; Kikuchi-Maki A. ve ark., 2003; Van der Meer A.ve ark.,2004)

1.2.3.4. HLA-G'nin Antijen Sunucu Hücrelerle Etkileşimi

İki popülasyon APC, makrofajlar ve dendritik hücreler, insan desidualize endometriyumunda, gebelik boyunca kalır. Bu güçlü, multifonksiyonel lökositler, sitotrofoblast hücreleri, uterin glandular epiteli ve uterin kan hücrelerine oldukça yakın yayılmış olarak lokalize oldukları (Vince G. S. ve ark.,1996; Nehemiah J. L. ve ark., 1981; Kammerer U. ve ark., 2000; Gardner L. ve ark.,2003; Hunt J. S., 1990) ve immün modülasyona ek olarak uterin ve plasental hemostazda önemli rol oynadıkları ispatlanmıştır (Vince G. S. ve ark.,1996; Nehemiah J. L. ve ark., 1981; Kammerer U. ve ark., 2000; Gardner L. ve ark., 2003; Hunt J. S., 1990).

Gebe endometriyumundaki APC:

- CD14+ makrofajları (Starkey P. M. ve ark., 1988; Vince G. S. ve ark., 1990)
- CD83+ matur dendritik hücreleri (Kammerer U. ve ark., 2000; Gardner L. ve ark.,2003; Miyazaki, S. ve ark., 2003)
- CD83- immatur makrofaj/dendritik hücreleri içerir.

HLA-G tetramerlerinin varlığında, farelerin greftleri reddetme kabiliyetinin çarpıcı bir biçimde azaldığı görülmüştür. İnsanda, HLA-G'nin APC üzerindeki immün baskılayıcı etkisi ya da diğer immün hücre fonksiyonu, pozitif uzun greft yaşamı olan kalp transplant alıcılarının serumunda yüksek seviyelerdeki HLA-G proteinlerinin bulunmasıyla belirtilmiştir (Lila N. ve ark., 2002).

1.2.4. HLA G Polimorfizmleri ve İnfertilite

Klasik HLA sınıf I genlerine kıyasla HLA-G düşük allelik polimorfizm gösterse de bazı patolojik durumlarda HLA-G geninin ifadenme seviyesinin ve mRNA izoformlarının profilinin normale göre farklı olmasının bu sınırlı polimorfizmle ilişkisi olabileceği ortaya koyulmuştur(O'Brien ve ark., 2001, Hviid ve ark., 2002).

HLA-G polimorfizminin düşük olmasına rağmen protein ifadenmesinin miktarını etkileyebileceği ve hatta bazı durumlarda gebeliğin oluşmasındaki bozukluklarla ilgili olabileceği düşünülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü, HLA-G*0105N olarak adlandırılan hükümsüz allel de dahil olmak üzere 15 HLA-G allelinin olduğunu belirtmektedir (Arnaiz-Villena ve ark., 1997).

HLA-G molekülleri, çeşitli intraselüler proteinlerden köken alan peptitler ile bağlantılıdır. HLA-G proteinleri neredeyse tamamen monomorfik moleküller olup bugüne kadar sadece 4 amino asit polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu bakımdan HLA-G geni insan genomundaki en polimorfik bölgeler olan HLA sınıf 1 ve 2 antijenlerinin aksine bir durum göstermektedir. HLA-G'deki polimorfizmler daha çok 5' protomer bölgede ve 3' transle edilmeyen bölgede görülmektedir (Hviid ve ark., 1999; Hviid ve ark., 2003).

Ekzon 1-4 bölgesindeki bugüne kadar belirlenen 13 polimorfizm bulunmaktadır. Ekzon 8'in translasyon görülmeyen bölgesindeki 14 baz çiftlik delesyon/insersiyon polimorfizmi ilk olarak Harrison ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. 14 bç'lik delesyon HLA-G transkriptinin alternatif uç birleştirmesinden sorumludur ve 3' UT bölgesinden 92 bazın çıkmasına neden olur. Bu 92 bç'nin bulunmadığı olgun transkript sabit karakterdedir. HLA-G transkriptinin stabilitesi bozulduğunda HLA-G proteinini etkiler. 14 bç'lik dizi delesyona uğramışsa 92bç'lik dizi olgun transkriptte kalır ve transkriptin stabilitesi bozulur. Bu durumun düşüklerle ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. mRNA stabilitesi 3' UT bölgesindeki AU'ca zengin kısımdan etkilenmektedir. Bu AU'ca zengin elementler AUUUA pentamerinden bir ya da birkaç kopya içermektedir ve mRNA'nın degradasyonuna yol açmaktadır. 14bç'lik dizinin AUUUG pentamerik başlangıcından dolayı AU pentamerik-benzeri etkiye sahip olduğu düşünülmekte olup bunun deadenilasyona katıldığı ve mRNA'nın bozunmasına neden olduğu düşünülmektedir. 92 bç'lik dizinin olmadığı transkriptte bu motifin yokluğu deadenilasyona yol açmakta ve böylece mRNA degradasyonuna karşı daha iyi bir direnç sağlanabilmektedir. Ancak 14bç'lik dizinin delesyonu veya insersiyonu halinde etrafındaki pentamerik dizinin silinmesi nedeniyle rolü tam olarak açıklanamamıştır. HLA-G mRNA'sının ve proteininin seviyesinin düşük

olması fonksiyon görmesini etkileyecektir. Bu da implantasyon ve gebelik süresince fetüs ve annenin HLA-G ifadenmesinin immün düzenleyici rolünü etkilemektedir (Hviid ve ark., 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Moleküler Teknikler*

2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA dizisinin in-vitro ortamda çoğaltılması yöntemidir. Bu yöntem bir polimeraz enzimiyle gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Yöntem hızlı ve az miktarda DNA örneği ile çalışma avantajı sağlamaktadır ve bu sayede moleküler biyoloji, adli tıp, evrim çalışmaları ve pek çok alanda tercih edilen önemli bir teknik olmuştur (Akar 1999).

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), son olarak zincirin uzamasıdır (polimerizasyon). Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40'dır. Bir PCR işleminde "n" döngü sonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık $2n$ kez çoğaltılmış olur (Akar 1999).

İlk adımda, çift zincirli DNA 90-95°C'de yaklaşık 5-10 dk süreyle tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır. Ardından sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve DNA'nın uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidlerin tek zincirli DNA'ya özgül olarak bağlanması sağlanır. Bu oligonükleotidler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Öner 2002).

PCR reaksiyonu için kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir (Akar 1999).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi birçok faktöre bağlıdır. DNA polimerazın çalışabilmesi için en etkin olduğu pH değerinin tüm uygulama boyunca korunabilmesi gereklidir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde Tris. HCl pH: 8,4 tampon olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tampon karışımında 50-60 mM düzeyinde K⁺ ve 100 µg/mg jelâtin bulunmasının çoğalmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Öner 2002).

Oligoprimerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(GC) + 2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliğı arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılan oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmalıdır aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri de rastgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermeme ve guanin, sitozin nükleotidlerinin %50'yi geçmemesi gerekmektedir (Öner 2002).

Kullanılan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan her bir dNTP'nin konsantrasyonunun eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur (Öner 2002).

Mg⁺⁺, DNA polimerazın çalışmasını sağlayan en önemli faktör olup pozitif yükü sayesinde, negatif yüklü DNA molekülü arasına girerek oligonükleotidlerin DNA molekülüne bağlanmasını kolaylaştırır. Fazla Mg⁺⁺ miktarı enzimin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzimin aktivitesini düşürür ve enzimin inaktive olmasına neden olur (Akar 1999).

2.1.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektroforez yüklü proteinlerin, DNA ve RNA'nın elektriksel alandaki hareketine dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektrik akımı, elektrolit bir tampon çözelti yardımıyla uygulanır. Seçilen pH değerine göre aynı özellikteki biyomoleküllerin iyonizasyonu benzer olacağından yürüme yalnızca bir kutuba doğru oluşur.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi, proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir.

Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N - N' - metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Yürüme bir boya (brom fenol mavisini) ile takip edilir.

Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelir.

Polimerleşme derecesi;

- Amonyum per sülfat (APS) ve
- N, N, N', N' - tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarı
- Sıcaklık

- pH'tan etkilenir.

Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar.

Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Akrilamid/bisakrilamid oranı yükseldikçe jellerde ısınma fazlalaşır, kırılabilirlik artar, daha kolay yıkanır.

TEMED veya amonyumpersülfatın derişimi arttırıldığında polimerizasyon hızlanır. Oksijen polimerizasyonu inhibe ettiği için, kullanımdan önce jel karışımının havasını almak gerekir.

2.1.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da “sequencing” DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir ve bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir.

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif ³²P ile işaretlenir. Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adım, herbirinde bazlardan biri için kimyasal kesimin meydana geldiği dört ayrı reaksiyon karışımında gerçekleşir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır (Lülecı 2000). DNA parçacıklarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yöntemi ile bantlar görüntülenir (Akar 1999, Öner 2002).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002). Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz enzimi ile kataliz edilir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur. PCR’da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanması ile gerçekleştirilir (Akar 1999). Yöntemde kullanılan ddNTP’lerin 3’ ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA’ya katılır ancak 3’-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilmez ve sentezi sonlanarak bir DNA parçası elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Herbir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP’den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır (Akar 1999, Öner 2002).

Günümüzde dizi analizi için otomatik DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyaları kullanılmaktadır (Öner 2002). Sistem, üzerindeki lazer ışığı ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotit dizisini belirler.

Bu çalışmada 14 bç’lik delesyon polimorfizmini tarama yöntemi olarak PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi kullanılmıştır. PCR ile delesyonu içine alan bölge çoğaltılmış ve örnekler ayırt etme gücü yüksek, Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)’ne yüklenmiştir. Bantlar gümüş nitrat ile görüntülenmiştir.

2.2. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı’nda yapılmıştır. Çalışma grubu, Ankara Üniversitesi Kadın Doğum ABD. Kısırlık

Merkezi ve Özel Gen Art Kadın Sağlığı Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezine başvuran bireylerden oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise, Ankara Üniversitesi Kadın Doğum ABD gebe polikliniğine gelen fertil kadınlardan ve herhangi bir yardımcı üreme tekniği kullanmadan gebe kalmış ve sağlıklı doğum yaptığı bilinen gönüllülerden oluşturulmuştur. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alınmıştır. Çalışmaya katılan tüm hasta ve kontroller bilgilendirilmiş ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair onay formu alınmıştır. İnfertil ve fertil gönüllülerden yaklaşık 5cc kan örneği alınmıştır.

İnfertil hasta grubu, infertilite nedeni bilinen kadınlar (58 kişi) ve herhangi görünen bir fizyolojik sorunu olmamasına karşı gebe kalamamış açıklanamayan infertilite tanısı konulmuş kadınlardan (65 kişi) oluşturulmuştur. Toplam 214 kadın çalışmaya alınmış olup bunlardan, 123 kadın infertil grupta, 91 kadın fertil kontrol grubunda yer almıştır.

2.3. Yöntem

Bu çalışmada kandan genomik DNA izolasyonu yapılmış, 14 bç lik delesyonu içeren ilgili bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve poliakrilamid jel elektroforezi ile delesyonun tespiti yapılmıştır. DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak sonuçlar doğrulanmıştır.

2.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışma gruplarını oluşturan hastalardan 1ml 0.5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere 2ml kan örneği alınmıştır. Genomik DNA eldesi için ticari olarak elde edilen DNA izolasyon kiti QIAGEN Gentra Puregene DNA izolasyon kiti kullanıldı. Elde edilen 150 µl DNA PCR için kullanmaya hazır durumda idi.

Gerekli Malzemeler:

- DNA izolasyon kiti (QIAGEN Gentra Puregene)

- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Amerika)
- Termomikser (65 C°, Wealtec Corp, Amerika)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)
- 1.5 ve 2 ml'lik eppendorf tüpleri
- Pipet ve pipet ucu
- %70'lik Etanol
- %100'lük İzopropil Alkol
- Kurutma Kâğıdı

DNA'nın elde edilmesi:

- Öncelikle 2 ml ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri hazırlandı.
- 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1350 µl kadar RBC lizis solüsyonu kondu.
- Üzerine 450 µl alt-üst edilmiş kan örnekleri eklendi.
- Karışım birkez daha alt-üst edilerek 40 sn 13500 g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dökülüp, kan peletten uzaklaştırıldı.
- Pelet 20 sn vortekslendi.

- Üzerine 450 µl Cell lysis solüsyonu kondu.
- Tekrar 20 sn vortekslendi.
- Üzerine 150 µl Protein Presipitasyon solüsyonu eklendi.
- Ve 13500'g de 1dk 40 sn santrifüj edildi.
- Hazırlanan 1.5 ml'lik tüplere %100'lük İzopropil Alkol'den 450 µl eklendi.
- Santrifüjlenen 2 ml'lik tüplerdeki süpernatant 1.5 ml'lik tüplerdeki Etanolün üzerine ters çevrilip dökülerek tüpler çalkalandı ve DNA'ların oluşması sağlandı.
- Tüpler tekrar 13500 g'de 1 dk 40 sn santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatant dökülüp ve kalan peletin üzerine 450 % µl 70'lik Etanol ilave edilerek dipte çöken DNA hareketlendirildi.
- 13500 g'de santrifüj edilerek süpernatant döküldü ve tüplerde kalan sıvı kurutma kağıdı ile alındı.
- Kurutulmuş tüplere 150 µl DNA Hidratasyon Solüsyonu eklenerek 65 C°'ye ayarlanmış termal mikserde 5 dk bekletildi ve -20 derecede saklandı.
- -20 derecede saklanan hasta ve sağlıklı DNA'ların kalitesini belirlemek için % 1'lik Agaroz jel elektroforezi yapıldı ve örnekler -20 derecede PCR yönteminde kullanılmak üzere saklandı.

2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

HLA-G geninin sekizinci ekzonundaki 14bç'lik delesyon polimorfizm bölgesini içine alan 224 bç'lik bölge PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Bunun için kullandığımız forward ve reverse primer dizileri aşağıdadır. Kullanılan primer dizilerinin sınırladığı bölge şekil de verilmiştir.

Forward 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3'

Reverse 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'

Çizelge 1: HLA G geninin PCR ile çoğaltılan 210 bç'lik bölümü görülmektedir. Primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızıyla işaretlenmiştir.

```
GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACCCTCACTGTGACTGATATGAATTTG
TTCATGAATATTTTCTGTAGTGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGA
GTGGCAA↓(Inserisyon)GTCCCTTTGTGACTTCAAGAACCCTGACTCCTCTTT
GTGCAGAGACCAGCCCACCCCTGTGCCACCATGACCCTCTTCCTCATGC
TGAAGTGCATTCCTTCC
```

PCR'ın Hazırlanması:

- PCR tüpleri hazırlandı.
- Karışım tüpünün içine sırasıyla
 - Distile su
 - 10X Reaksiyon tamponu (Fermentas, Litvanya)
 - dNTP karışımı (dTTP, dCTP, dATP, dGTP) (Fermentas, Litvanya)

- Forward Primer (Metabion International AG - Almanya)
- Reverse Primer (Metabion International AG - Almanya)
- Magnezyum Klorür (MgCl) (Fermentas, Litvanya)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve
- 2,3 µl DNA örnekleri eklenerek termalcycler'a kondu.

Son konsantrasyonlar 25 µl hacim için; 100 ng genomik DNA, 1x Buffer, dTTP, dCTP, dATP, dGTP bazları dNTP mix olarak 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, herbir primer 0.6 mM ve Taq polimeraz 1 ünite olarak ayarlandı.

Termalcycler'da bütün PCR reaksiyonlarında 94 °C de 4 dakika başlangıç denatürasyonu ve PCR sıcaklıkları 94 °C de 50 saniye denatürasyon, 61°C de 50 saniye bağlanma ve 72 °C de 50 sn uzama olmak üzere 35 döngü olarak ayarlandı. 72°C de 7 dak bir son uzama gerçekleştirildi. 4 °C son sıcaklık olarak belirlendi.

2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünlerini %1'lik agaroz jel için 1.5 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 150 ml'ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdede hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) % 5'lik stok solüsyonundan 2'şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 5 µl,

temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 2 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. Ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII Fermentas, Litvanya) ürünlerle birlikte jele 2 µg kadar yüklenir. 100 V akımda 20 dk kadar yürütülür (Wealtec, Tayvan). Ultraviyole ışıktaki (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflanır.

2.3.4. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Poliakrilamid jelinin döküleceği camlar distile su ile yıkanıp alkol ile silindikten sonra camlar arasına 1,5 mm kalınlığında spacerlar yerleştirilip, camlar sabitlenmiştir.

Bu çalışmada %7'lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Bu jel için %40'luk, 49:1 oranındaki akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 380 g Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 g N-N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözülür ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır (Sambrook 1989).

Jelin polimerleşmesi için kullanılan % 10'luk Amonyum Persülfat; 1 g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 mL'lik hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

Jel 12,34 mL %40'luk akrilamid/bisakrilamid solüsyonu, 14 mL TBE 5X solüsyonu, 40,16 mL distile su ve 3,5 mL gliserol (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Karışım 0,22 µm filtreden süzöldükten sonra vakum ile havası alınmıştır. Ardından bu jel içeriğine 0,6 mL % 10'luk Amonyum Persülfat ve 40 mL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanan camlar arasına dökülmüştür. Jel polimerleştikten sonra 1,5 mm'lik tarak camlar arasına yerleştirilerek örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlanmıştır.

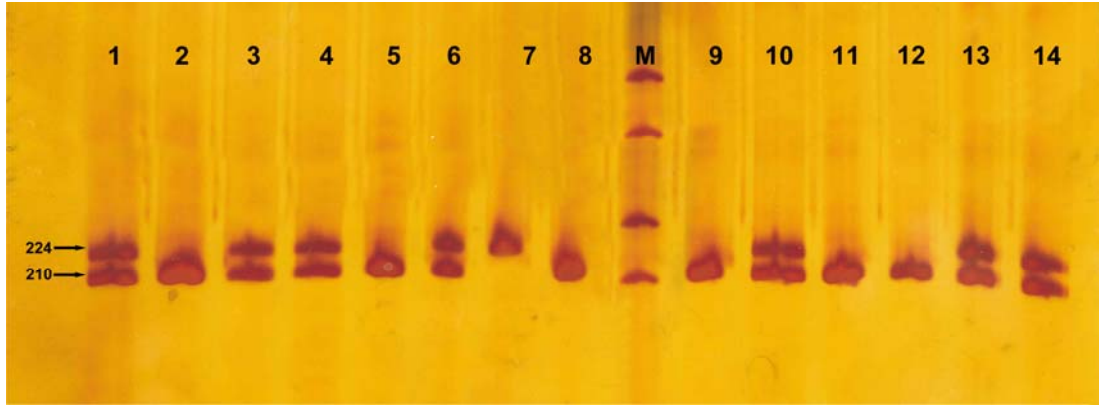
Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkartılmış ve camlar vertikal jel elektroforez sistemine (BioRad, ABD) yerleştirilmiştir.

Sistemde tampon olarak TBE 1X solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler 200 volt akımda altında, +4 C de 16 saat yürütülmüştür.

2.3.4.1. Poliakrilamid Jeli İçin Gümüş Boyama

%1'lik stok gümüş nitrat %0,1'lik olacak şekilde 100 mL % 1'lik stok gümüş nitrat solüsyonu, 900 mL distile su kullanılarak seyreltilir. Jeller bu solüsyonda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra formaldehit ilave edilmiş % 1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonu ile boyanmıştır. Jel % 0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu ile muamele edilerek boyama işlemi sonlandırılmıştır.

Böylece jeller görünür hale getirilerek PCR ürünüde beklenen 14 bçlik fark, bant boylarının büyüklüklerine göre belirlenmiştir(Şekil 7). Jeller kurutularak saklanmıştır.



Şekil 7: 14 bç lik delesyon polimorfizminin incelendiği poliakrilamid jel örneği. M: marker, 2, 5, 8, 9, 11, 12 numaralı kuyularda 210 bç lik bantlar görülmekte olup, 14 bç lik delesyonun mevcut olduğu örneklerdir. 7 numaralı kuyuda 224 baz çiftlik bant görülmekte olup, bu delesyonun görülmediği normal örnektir. 1, 3, 4, 6, 10, 13, 14 numaralı örnekler 224 ve 210 bç lik bantların her ikisini de göstermekte olup heterozigot örnekleri karakterize etmektedir.

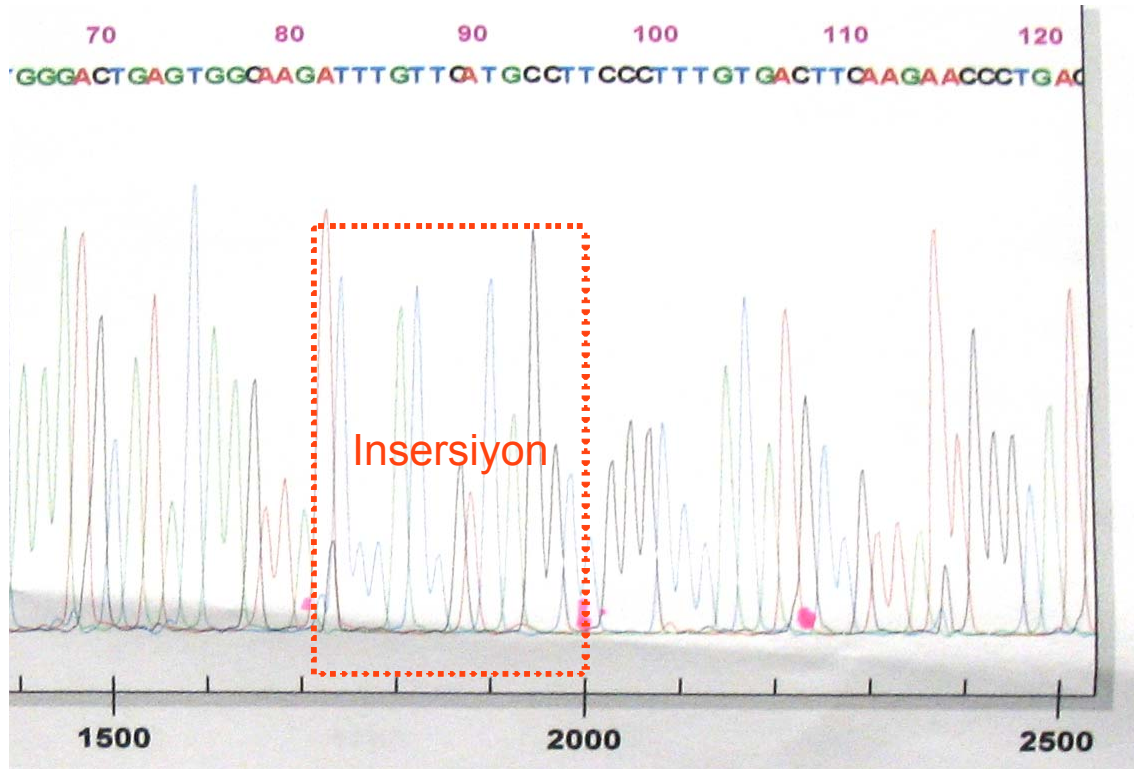
2.3.5. DNA Dizi Analizi

PCR sonrasında poliakrilamid jel elektroforezi ile mutasyon tespit edilen örneklerde, jel görüntülerinin doğrulanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Bant boylarına bakılarak delesyon taşıyan 2 örnek ve insersiyon taşıyan 2 örnek seçilerek dizi analizi yapılmıştır.

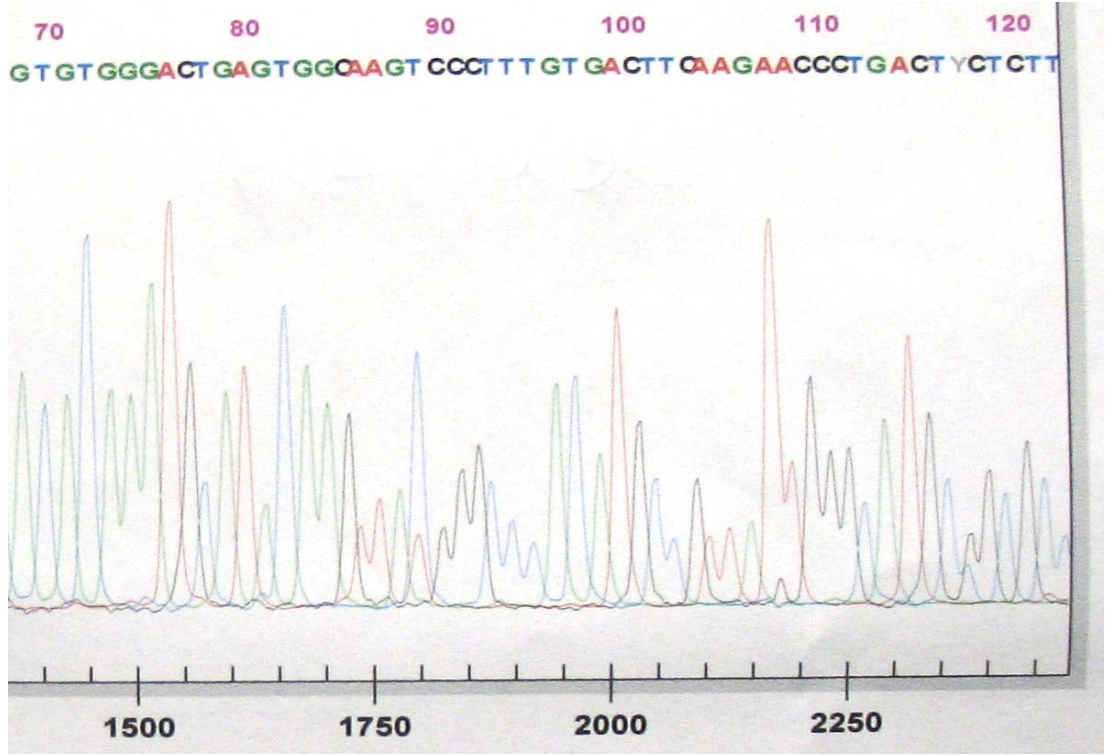
DNA dizi analizi öncesinde PCR ürünlerinin dNTP ve primer artıklarından temizlenmesi için kolonlu pürifikasyon kiti kullanılmıştır (Roche, ABD).

Bu çalışmada istenen DNA parçacığının nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemli çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD). Cihaz için 0,2 mL'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Her bir örnek için 8 µL sekans solüsyonu (premix; 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1µL dNTP karışımı, 2µL ddUTP, 2µL ddGTP, 2µL ddCTP, 2µL ddATP, 1µL polimeraz enzimi), 1µL temizlenmiş PCR ürünü, 2 pmol sağ veya sol oligonükleotid ve hacimi 20 µL'ye tamamlayacak kadar distile su konularak "cycle sequencing" gerçekleştirilmiştir. Bu program 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96C'de 20

sn denatürasyon, 50°C’de 20 sn yapışma ve 60°C’de 4 dk’lık uzama evresi şeklinde gerçekleşmektedir. “Cycle sequencing” sonlandıktan hemen sonra örneklerin içine reaksiyonun durdurulması için her bir örnek için 5 µL durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/mL’lik Glikojen) ve 60 µL %95’lik soğuk etanol eklenerek +4°C’de 4000 rpm’de 4 dk santrifüj edilmiştir (Hettich, Almanya). Üstteki kısım dökülerek %70’lik alkolden 200 µL eklenmiş, +4°C’de 4000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek üstteki kısım dökülmüştür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında 45 dk kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyon eklenerek DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanmıştır. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayardaki CEQ Sequencing Software programı aracılığı ile sonuçlar görünür hale getirilmiştir.



Şekil 8: HLA-G geninin 14 bp’lik insersiyonu içeren bölgesinin DNA dizi analizi ile çoğaltılmış örneği.



Şekil 9: HLA-G geninin 14 bç lik delesyonunu içeren bölgesinin DNA dizi analizi ile çoğaltılmış örneği.

2.3.6. İstatistiksel Analiz

Genotip dağılımları ve alel sıklıkları hasta ve kontrollerde karşılaştırılmıştır. Verilerin analizinde Binary logistic regression modeli kullanılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında odds ratios (OR) olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. Analizler MINITAB® Release 15 Statistical Software for Windows programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışmaya 123 infertil, 91 fertil kontrol olmak üzere toplam 214 kadın dahil edilmiştir. İnfertil hastalar iki grup altında toplanmıştır: Birinci grup; infertilite nedeninin sorgulanmadığı hastaların tamamını içeren 123 infertil kadından, ikinci grup ise açıklanamayan infertilite tanısı olan gebe kalamamış 65 kadından oluşmuştur. Kontrol grubu yardımcı üreme teknikleri kullanmadan gebe kalmış ve en az bir çocuk doğurmuş fertil kadınlardan oluşturulmuştur (n=91).

Hasta ve kontrol grubu kadınlarda HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun insersiyon polimorfizminin genotipik dağılımları ve alel frekansları incelenmiştir. Kadın infertilite için risk artışı getirdiği düşünülen del/del genotipi başta olmak üzere genotipler dağılımları ve alel sıklıkları hasta ve kontrollerde karşılaştırılmıştır. Verilerin analizinde Binary logistic regression modeli kullanılmıştır. Sonuçlar % 95 güven aralığında odds ratios (OR) olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrollerin genotipik değerlendirmesi aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir: HLA-G geninin 3' UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun her iki alelde birden homozigot halde bulunması (del/del), söz konusu delesyonun tek alelde heterozigot olarak bulunması (del/ins) ve hiç bulunmaması (ins/ins) olarak değerlendirilmiştir.

İncelenen toplam 123 infertil kadında delesyonu homozigot olarak taşıyanların sayısı 42 kişi (% 34,15) olarak bulunmuştur. Heterozigot hastaların sayısı ise 61 kişi (% 49,59) dir. Delesyonu hiç taşımayanlar ise 20 kişi (% 16,26) olarak tespit edilmişlerdir. Fertil kontrollere baktığımızda, incelenen 91 kişide delesyonu homozigot olarak taşıyanların sayısı 26 kişi (% 28,57), heterozigot olarak taşıyanlar ise 47 kişi (% 51,65) olarak bulunmuştur. 18 fertil kontrol ise (% 19,78) homozigot insersiyon taşımaktadır. İnfertil hastalar ve kontroller karşılaştırıldığında 14 bazlık delesyonu homozigot olarak taşımanın ufak bir risk artışı getirdiği düşünülmüşse de istatistiksel olarak anlamlı değildir (OR:1,30, p=0.385). Alel bazında baktığımızda

ise 14 bç.lik delesyon hasta ve kontrollerde anlamlı bir farklılık göstermemiştir (OR:1.2, p=0.348). (Çizelge 2)

Çizelge 2: HLA-G geninin 3'UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun-insersiyon polimorfizminin infertil hasta ve fertil kontroldeki genotip dağılımları ve alel sıklıkları.

HLA-G UTR 14 bç Del/İns	İnfertil Hasta		Fertil Kontrol		OR	P	95% CI
	(n=123)	%	(n=91)	%			
Genotipler							
Del/Del	42	34,15%	26	28,57%	1,30	0,385	0,72 - 2,33
Del/İns	61	49,59%	47	51,65%	0,92	0,766	0,54 - 1.58
İns/İns	20	16,26%	18	19,78%	0,79	0,507	0,39 - 1,59
Alel Frekansı							
Del	145	58,94%	99	54,40%	1,2	0,348	0,82 - 1,77
İns	101	41,06%	83	45,60%	0,83	0,348	0,56 - 1,22

Açıklanamayan infertilite tanılı 65 kadın incelendiğinde, 24 (% 36,92) kişinin homozigot delesyon taşıdığı, 30 (% 46,15) kişinin del/ins heterozigot olduğu ve 11 (% 16,92) kişinin homozigot ins/ ins olduğu görülmüştür. Açıklanamayan infertilite hastaları ve kontroller karşılaştırıldığında 14 bazlık delesyonu homozigot olarak taşımanın yaklaşık 1.5 kat risk artışı getirdiği görülmüşse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (OR:1.46, p=0.272). Alel bazında baktığımızda ise 14bç.lik delesyonun sıklığı hastalar ve kontroller kıyaslandığına istatistiksel olarak anlamlı değildir (OR:1.26, p=0.324). (Çizelge 3).

Çizelge 3: HLA-G geninin 3'UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun-insersiyon polimorfizminin açıklanamayan infertil hasta ve fertil kontroldeki genotip dağılımları ve alel sıklıkları.

HLA-G UTR 14 bç Del/İns	Açıklanamayan İnfertil Hasta		Fertil Kontrol		OR	P	95% CI
	(n=65)	%	(n=91)	%			
Genotipler							
Del/Del	24	36,92%	26	28,57%	1,46	0,272	0,74 - 2,88
Del/İns	30	46,15%	47	51,65%	0,8	0,498	0,42 - 1,52
İns/İns	11	16,92%	18	19,78%	0,83	0,65	0,36 - 1,89
Alel Frekansı							
Del	78	60,00%	99	54,40%	1,26	0,324	0,80 - 1,98
İns	52	40,00%	83	45,60%	0,8	0,324	0,50 - 1,25

Açıklanamayan infertilite hastaları çıkarıldıktan sonra infertil kadınların sıklıklarına bakıldığında homozigot delesyon taşıyan 18 (% 31,03) kişi, heterozigot delesyon taşıyan 31 (% 53,45) kişi ve homozigot insersiyon taşıyan 9 (% 15,52) kişinin olduğu görülmüştür. Bu hastalar kontrollerle kıyaslandığında del/del genotipinin OR'si 1,13 olarak bulunmuştur. (Çizelge 4).

Çizelge 4: HLA-G geninin 3'UT bölgesindeki 14 bazlık delesyonun açıklanamayan infertil hastalar çıkarıldıktan sonraki genotip dağılımları.

HLA-G 3' UTR 14 bç Del/İns	İnfertil- Açıklanamayan İnfertil Hasta		Fertil Kontrol		OR	P	95% CI
	(n=58)	%	(n=91)	%			
Genotipler							
Del/Del	18	31,03%	26	28,57%	1,13	0,748	0,55 - 2,31
Del/İns	31	53,45%	47	51,65%	1,07	0,83	0,56 - 2,08
İns/İns	9	15,52%	18	19,78%	0,74	0,507	0,31 - 1,79

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada maternal fetal toleransta rolü olan HLA-G antijenindeki 3' UT bölgesinde bulunan 14 bç.lik delesyon insersiyon polimorfizmi incelenmiş ve kadınlarda infertilite ile ilişkisi araştırılmıştır.

HLA-G, doğal öldürücü hücreler ile ilişkili immün yanıtta görev alan bir HLA klas1 antijenidir. İlk olarak uterin doğal katil hücrelerindeki inhibitör reseptörler için ligand olarak tanımlanmış ve maternal-fetal toleransta katkısı olduğu düşünülmüştür.

HLA-G'nin uterin doğal katil hücrelerindeki KIRDL4 reseptörüne bağlanması implantasyon ve plasental damarlanma ve gelişime yardımcı olan sitokin ve anjiojenik faktörlerin salgılanması düzenler. Proanjiojenik faktörleri dengelemek için oluşan antianjiojenik etkiler trofoblasttan salgılanan HLA-G ye atfedilmiştir (Fons P. ve ark.,2006). HLA-G ifadelenmesindeki düşüş ile tekrarlayan kendiliğinden düşük ve preeklampsi gibi hamilelik bozuklukların birlikteliği, HLA-G'nin maternal-fetal toleransta anahtar tolerojenik molekül olduğunu göstermiştir (Hviid, T.V.2006). Yine in vitro fertilizasyon çalışmalarında, embriyo sHLA-G ifadelenmesinin uterin implantasyonda hayati olduğu görülmüştür. Anne kanında ovulasyondan önce dahi farklı orijinden gelen sHLA-G belirlenmesi, endometriyal alma eğilimini teşvik ederek insan embriyo implantasyonunu etkilediği düşünülmektedir (Rizzo R. Ve ark.,2007).

Embriyonun başarılı implantasyonunda ve gebeliğin sürdürülmesinde oynadığı rol sHLA-G düzeyini belirleyen genetik değişikliklerin araştırılmasına yol açmıştır. Çözünebilir HLA-G düzeyini mRNA düzeyini ve kararlılığını etkileyerek düşürdüğü gösterilen 3' UTR da bulunan 14 bazlık delesyon insersiyon polimorfizmi ile ilgili çalışmalar vardır (Hviid T.V. ve ark.,2006). Polonya da yapılan bir çalışmada sHLA-G moleküllerinin belli HLA-G aleleriyle birliktelik gösterdiği, bunun da sHLA-G düzeyinin genetik olarak kontrol altında olduğunun bir göstergesi olduğu öne sürülmüştür (Spak-Szmigiel 2007) .

Biz çalışmamızda infertil kadınlarda HLA-G 3'UTR 14 bçlik delesyonun sıklığının fertillerden yüksek olduğunu, fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik (toplam infertil (n=123) 34,15%; Fertil Kontrol (n=91) 28,57%). Yine bu çalışmada homozigot delesyon taşıyanların oranı açıklanamayan infertilite grubunda daha yüksek bulunmuştur. Bu grup kontrollerle karşılaştığında homozigot delesyon taşımanın yaklaşık 1.5 risk artışı getirdiği görülmüştür. Bununla beraber bu yükseklikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İnfertil hasta grubundan açıklanamayan infertilite olarak bize gönderilen kadınları çıkardığımızda homozigot delesyon taşıma sıklığının düştüğünü gördük. Bu farklılığın nedenleri bizim infertil hasta grubumuzun heterojenliği olabilir. Bu grupta infertilite nedenleri birbirinden farklı çeşitli hastaların olması, bazı kadınlarda infertilitenin genetik kökeni olmayan nedenlerden kaynaklanıyor olması bu düşüklüğün olası nedenleri arasında olabilir. İnfertilite nedenleri arasında iyi bir ayırım yapılarak incelenecek gruplarda, HLA G polimorfizmlerin özellikle de 3'UTR 14 bç delesyonunun sıklığının artabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde HLA-G ve infertilite üzerine yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır. Çalışmalar daha çok tekrarlayan kendiliğinden düşükler üzerinedir ve sonuçlar çelişkilidir. Farklı etnik gruplarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Beyaz ırkta HLA-G ve tekrarlayan kendiliğinden düşük olgularında yapılan bir çalışmada fertil kadınlarda heterozigot formun beklenenin üzerinde olduğu ve annenin heterozigotluğu durumunda ins/ ins genotipindeki fetüsün daha çok şansı olabileceği söylenmiştir (Hviid ve ark., 2002). Çin'den yapılan bir çalışmada, Xue ve arkadaşları tekrarlayan kendiliğinden düşüklerde HLA-G genindeki 14 bç del/ins polimorfizmin sık görüldüğünü bildirmişlerdir (Xue ve ark., 2007). Bu sonuç daha önce Hindistan dan Tripathi ve ark. yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir (Tripathi ve ark., 2004). Farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda bildirilen farklı sonuçlar HLA-G geninde, farklı toplumlardan yapılacak detaylı genotiplendirme çalışmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz sonuçlar HLA-G geni 3'UTR bulunan del/del polimorfizminin kadınlarda infertilite ile ilişkili olabileceğini ama bunun için daha geniş hasta ve kontrol gruplarında çalışılması gerektiğini düşündürmektedir. Açıklanamayan infertilite grubundaki homozigot delesyon oranının yüksekliği özellikle bu grupta çalışmaların yoğunlaştırılmasının anlamlı olabileceğini göstermiştir. HLA-G genindeki alellerin ya da 3' UTR dışındaki diğer polimorfizmlerinde çalışılmasının, infertilite açısından anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

HLA-G Genindeki 3'UTR Polimorfizminin İnfertil Kadınlarda İncelenmesi

HLA-G, doğal öldürücü hücreler ile ilişkili immun yanıtta görev alan bir HLA sınıfı antijenidir. Düşük polimorfik özelliği, sınırlı doku dağılımı, kısmi ifadenme ve immün toleransa yol açan biyolojik özellikleriyle diğer sınıfı moleküllerinden farklılık gösterir. HLA-G ilk olarak uterin doğal öldürücü hücrelerindeki inhibitör reseptörler için ligand olarak tanımlanmış ve maternal-fetal toleransta katkısı olduğu düşünülmüştür. HLA-G ekspresyonundaki azalma ile tekrarlayan kendinden düşük ve preeklampsi gibi hamilelik bozuklukların birlikteliği, HLA-G'nin maternal-fetal toleransta anahtar tolerojenik molekül olduğunu göstermiştir. HLA-G geninin 3' kodlama yapmayan bölgesinde bulunan 14 bp'lik delesyon-insersiyon polimorfizmi, mRNA düzeyini ve kararlılığını dolayısıyla çözünebilir HLA-G düzeyini etkilemektedir. Çalışmamızda HLA-G geninde 3'UTR'deki del/ins polimorfizminin, ülkemiz kadınlarında infertiliteye yatkınlık yapan genetik faktörlerden biri olup olmadığını araştırdık.

14 bp'lik delesyon-insersiyon polimorfizmini belirlemek için ilgili bölge PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve PAGE yapılarak bant büyüklükleri karşılaştırılmıştır.

HLA-G genindeki ins/del polimorfizmi 123 infertil ve 91 fertil olmak üzere toplam 214 kadında incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalar, toplam infertil hastalar (n1=123) ve açıklanamayan infertil hastalardan (n2=65) oluşturuldu. Kontrol grubu, fertil kadınlardan (n3=91) oluşturuldu.

HLA-G geninde tanımlanmış olan 14 bp'lik delesyon polimorfizminin her bir grup için dağılımları tespit edilerek değerlendirilmiştir. Homozigot yapıda delesyon, heterozigot yapıda delesyon ve hiç delesyon bulunmaması durumlarına ait sıklıklar bakımından gruplar arasında oransal olarak farklılıklar gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$).

ANAHTAR KELİMELEER: DNA, HLA-G, PCR, POLİMORFİZM

SUMMARY

The Investigation of The 3'UTR Polymorphism of the HLA-G Gene on Infertile Women

HLA-G is a Class I antigen involved in the immune response related with the natural killer cells. It shows differences from the rest of the Class 1 molecules due to its low polymorphism, limited tissue distribution, partial expression and the biological properties providing immune tolerance. At first, HLA-G was defined as a ligand for the inhibitory receptors of uterine natural killer cells and thought to have a contribution in maternal-fetal tolerance. The reduction seen in the expression of HLA-G coupled with the pregnancy defects like recurrent spontaneous abortion and preeclampsia suggests that HLA-G can be a key tolerogenic molecule in maternal-fetal tolerance.

The 14 bp deletion-insertion polymorphism of HLA-G gene on 3' untranslated region affects mRNA level and stability, and thus it affects the soluble HLA-G level. In this study, we investigated whether this deletion-insertion polymorphism on the 3' untranslated region of the HLA-G gene is a genetic factor on women infertility in Turkey. In order to detect 14 bp deletion-insertion polymorphism, related region was multiplied by PCR method, compared bands size by PAGE.

The ins/del polymorphism on HLA-G gene was investigated on 214 women, as 123 infertile and 91 fertile. Patients, attending this study were composed of total infertile patients (n1=123), unexplained infertile patients (n2=65). Control group was generated from the fertile women (n3=91).

The defined 14 bp deletion polymorphism on HLA-G gene was evaluated for groups. Although there were differences between frequency of homozygote deletion, heterozygote deletion and non deleted conditions, no statistically significant difference was found ($p>0.05$).

KEY WORDS: DNA, HLA-G, PCR, POLYMORPHISM

KAYNAKLAR

- ABBAS AK, LICHTMAN ALI, POBER JS (eds): *Cellular and Molecular Immunology*. W.B.Saunders, Philadelphia, 2000, s.4-12.
- AKAR N, (1999) *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Ankara, AÜTF Antip A.Ş. Yayınları.
- ALLAN, D. S., MCMICHAEL, A. J., BRAUD, V. M. (2000) The ILT family of leukocyte receptors. *Immunobiology* 202,34-41
- ARNAIZ-VILLENA A., MARTINEZ-LASO J., ALVAREZ M., CASTRO M.J., VARELA E., GOMEZ-CASADO E., SUAREZ B., RECIO M.J., VARGAS-ALARCON G., MORALES P.: *Primates MHC-E and -G Alleles*. *Immunogenetics* 46.251, 1997.
- ASHKAR, A. A., CROY, B. A. (1999) Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol. Reprod.* 61,493-502
- ASHKAR, A. A., DI SANTO, J. P., CROY, B. A. (2000) Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.* 192,259-270
- ATHERTON F, HOWEL D (1995) Psychological morbidity and the availability of assisted conception: a group comparison study. *J Public Health Med*;17(2):157-60
- BONGSO A. *Handbook on Blastocyst Culture*. 1999:13,21
- BROCKINGTON I (1996) *The Desire for Children. Motherhood and Mental Health*. Brokington I. Oxfors Univ. Pr., Ch.1,1-38
- BULMER, J. N., PACE, D., RITSON, A. (1988) Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod. Nutr. Dev.* 28,1599-1613
- CAROSELLA E.D, MOREAU P, LEMAOULT J VE FREISS N.R.,(2008) HLA-G: from biology to clinical benefits ,Trends in Immunology Vol.29 No.3
- CAROSELLA E.D., PAUL P., MOREAU P., ROUAS-FREISS N. (2000) HLA-G and -E: Fundamental and Physiopathological Aspects. *Immunol. Today* 21.532.
- CAROSELLA, E.D. et al. (2003) HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.* 81, 199–252
- CHEN, H. L., YANG, Y. P., HU, X. L., YELAVARTHI, K. K., FISHBACK, J. L., HUNT, J. S. (1991) Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am. J. Pathol.* 139,327-335
- COLONNA, M., NAVARRO, F., BELLON, T., LLANO, M., GARCIA, P., SAMARIDIS, J., ANGMAN, L., CELLA, M., LOPEZ-BOTET, M. (1997) A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186,1809-1818

- CONTINI, P., GHIO, M., POGGI, A., FILACI, G., INDIVERI, F., FERRONE, S., PUPPO, F. (2003) Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur. J. Immunol.* 33,125-134
- CREPUT C, DURRBACH A, MENIER C, GUETTIER C, SAMUEL D, DAUSSET J, CHARPENTIER B, CAROSELLA ED AND ROUAS-FREISS N (2003) Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 39,587–594.
- CROUCH SPM, CROCKER IP, FIETCHER J. The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocyte function. *J Immunol* 1995;155:5436-5443.
- ÇOLGAR U., ŞENTÜRK L.(1995) *Açıklanamayan İnfertilite. Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite.* Sy.241-
- DELVES PJ. ROITT İM.The imune system (First part). *N EnglJ Med* 2000; 343(1):37-49
- FAINARDI E, RIZZO R, MELCHIORRI L, VAGHI L, CASTELLAZZI M, MARZOLA A, GOVONI V, PAOLINO E, TOLA MR, GRANIERI E.(2003) Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsingremitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. *J Neuroimmunol* 142,149–158.
- FONS, P. (2006) Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 108, 2608–2615
- FORSTHUBER T, YIP HC, LEHMANN PV. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996;271:1728-1730.
- FOURNEL, S., AGUERRE-GIRR, M., HUC, X., LENFANT, F., ALAM, A., TOUBERT, A., BENSUSSAN, A., LE BOUTEILLER, P. (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J. Immunol.*164,6100-6104
- FREIDMAN T. (1989). *Infertility And Assisted Reproduction.* Bailiere’s Clinical Obst. And Gyne. Scandinavica, 66.517-521
- FUJII T, ISHITANI A AND GERAGHTY DE (1994) A soluble form of HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 153,5516–5524.
- GARDNER, L., MOFFETT, A. (2003) Dendritic cells in the human decidua. *Biol. Reprod.* 69,1438-1446
- GERAGHTY D.E., KOLLER B.H. VE ORR H.T. (1987) A Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene That Encodes a Protein with Shortened Cytoplasmic Segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,9145-9149.
- GIVAN, A. L., WHITE, H. D., STERN, J. E., COLBY, E., GOSSELIN, E. J., GUYRE, P. M., WIRA, C. R. (1997) Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38,350-359
- GIVENS JR., KURTZ BR.(1986). *Understanding Pcos. Gonadotropin Down Regulation in Gynecological Practice.* 355

- HSI, B. L., HUNT, J. S., ATKINSON, J. P. (1991) Differential expression of complement regulatory proteins on subpopulations of human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 19,209-223
- HULL MG, GLAZENER CM, KELLY NJ, CONWAY DI, FOSTER PA, HINTON RA, COULSON C, LAMBERT PA, WATT EM, DESAI KM BR MED J (Clin Res Ed). 1985;291(6510):1693.
- HUNT J.S., PETROFF M.G., MCINTIRE R. H., VE OBER C (2005) HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB Journal*; 19.681-693
- HUNT, J. S. (1989) Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.* 16,1-17
- HUNT, J. S. (1990) Current topic: the role of macrophages in the uterine response to pregnancy. *Placenta* 11,467-475
- HUNT, J. S., AND D. E. GERAGHTY (2005). Commentary. Soluble HLA-G isoforms, HLA-G5 and HLA-G6: technical deficiencies lead to misinterpretations. *Mol. Hum. Reprod.* 11:715-717.
- HUNT, J. S., JADHAV, L., CHU, W., GERAGHTY, D. E., OBER, C. (2000) Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183,682-688
- HUNT, J. S., PACE, J. L., MORALES, P. J., OBER, C. (2003) Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G. *Mol. Hum. Reprod.* 9,729-735
- HVIID T.V., HYLENIUS S., HOEGH A.M., KRUSE C, CHRISTIANSEN O.B. (2002) HLA-G Polymorphisms in Couples with Recurrent Spontaneous Abortions. *Tissue Antigens* 60:122,
- HVIID T.V., HYLENIUS S., RØRBYE C. VE NIELSEN L.G. (2003) HLA-G Allelic Variants are Associated with Differences in The HLA-G mRNA Isoform Profile and HLA-G mRNA Levels. *Immunogenetics* 55, 63-79.
- HVIID T.V., SORENSEN S. VE MORLING N. (1999) Polymorphism in The Regulatory Region Located More Than 1.1 Kilobases 5' to The Start Site of Transcription, The Promoter Region, and Exon 1 of The HLA-G Gene. *Hum. Immunol.* 60, 1237-1244.
- HVIID T.V.F. (2005) HLA-G in Human Reproduction: Aspects of Genetics, Function and Pregnancy Complications Human Reproduction Update Advance Access published November 9, 1-24
- HVIID, T.V. (2006) HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum. Reprod. Update* 12, 209–232
- HVIID, T.V. et al. (2006) Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to solubleHLA-G and IL-10 expression. *Hum. Immunol.* 67, 53–62
- ISHITANI AG AND GERAGHTY DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89,3947–3951.
- JAFFE SB (1991) The basic infertility investigation. *Fertil Steril* 56.599
- JELEWICZ R, WALLACH EE (1995) Evaluation of the infertile couple in reproductive medicine and surgery. Mosby- Year Book Inc. St. Louis. Pg. 371

- KAMMERER, U., SCHOPPET, M., MCLELLAN, A. D., KAPP, M., HUPPERTZ, H. I., KAMPGEN, E., DIETL, J. (2000) Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 157,159-169
- KANAI, T., FUJII, T., KOZUMA, S., YAMASHITA, T., MIKI, A., KIKUCHI, A., TAKETANI, Y. (2001) Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol. Hum. Reprod.* 7,195-200
- KAPASI, K., ALBERT, S. E., YIE, S., ZAVAZAVA, N., LIBRACH, C. L. (2000) HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 101,191-200
- KHOSROTEHRANI K, LE DANFF C, REYNAUD-MENDEL B, DUBERTRET L, CAROSELLA ED AND ARACTINGI S (2001) HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117,750–752.
- KİŞNİŞÇİ HA, GÖKŞİN E, DURUKAN T, ÜSTAY K, AYHAN A, GÜRKAN T, ÖNEROĞLU LS. *Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ed. Ankara: Güneş,1996.s 1119-1129,1287.
- KIKUCHI-MAKI, A., YUSA, S., CATINA, T. L., CAMPBELL, K. S. (2003) KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J. Immunol.* 171,3415-3425
- KIRSZENBAUM M, MOREAU P, GLUCKMAN E, DAUSSET J AND CAROSELLA E (1994) An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91,4209– 4213
- LE BOUTEILLER, P. (1994) HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit. Rev. Immunol.* 14,89-129
- LE DISCORDE M, MOREAU P, ROUAS-FREISS N AND CAROSELLA E (2002) HLA-G: immune tolerance in normal and pathological physiology. *Pathol Biol* 50,45–51
- LEE, N., GOODLETT, D. R., ISHITANI, A., MARQUARDT, H., GERAGHTY, D. E. (1998) HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J. Immunol.* 160,4951-4960
- LEE, N., LLANO, M., CARRETERO, M., ISHITANI, A., NAVARRO, F., LOPEZ-BOTET, M., GERAGHTY, D. E. (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,5199-5204
- LEMAOULT, J., KRAWICE-RADANNE, I., DAUSSET, J., CAROSELLA, E. D. (2004) HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101,7064-7069
- LI, X. F., CHARNOCK-JONES, D. S., ZHANG, E., HIBY, S., MALIK, S., DAY, K., LICENCE, D., BOWEN, J. M., GARDNER, L., KING, A., et al (2001) Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86,1823-1834
- LILA N, AMREIN C, GUILLEMAIN R, CHEVALIER P, LATREMOUILLE C, FABIANI JN, DAUSSET J, CAROSELLA ED AND CARPENTIER A (2002) Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105,1949– 1954.

- LIN H, MOSMANN TR, GAILBERT L, TUNTIPOPIAT S, VVEGMANN TG. Synthesis of Thelper2 -type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;155:5436-5443.
- LOZANO JM, GONZALES R, KINDELAN JM, ROUASS-FREISS M, CABALLOS R, DAUSSET J, CAROSELLA ED AND PENA J (2002) Monocytes and T lymphocytes in HIV-1 positive patients express HLA-G molecules. *AIDS* 16,347–351.
- LÜLECİ M,S M., ALPER Ö (2000). *Renkli Genetik Atlası*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.
- MARCHALL-BRASS-GONCALVES R, ROUAS-FREISS N, CONNAN F, CHOPPIN J, DAUSSET J, CAROSELLA ED, KIRSZENBAUM M AND GUILLET J (2001) A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 33,2355–2359.
- MARZI, M., VIGANO, A., TRABATTONI, D., VILLA, M. L., SALVAGGIO, A., CLERICI, E., CLERICI, M. (1996) Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 106,127-133
- MEDAWAR, P. B. (1953) Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 44,320-338
- MENKEN J, TRUSSEL J, LARSEN U (1975) Age and infertility. *Science* 233: 1389, 1986
- MIYAZAKI, S., TSUDA, H., SAKAI, M., HORI, S., SASAKI, Y., FUTATANI, T., MIYAWAKI, T., SAITO, S. (2003) Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J. Leukoc. Biol.* 74,514-522
- MONCAYO H, SOLDER E, ABFALTER E, MONCAYO R. Cytokines and the maternal-fetal interface. *Immunol Today* 1994;15:295.
- MORALES P., CORELL A., MARTINEZ-LASO J., MARTIN-VILLA J.M., VARELA P., PAZ-ARTAL E., AILENDE L.M., ARNAIZ-VILLENA A. (1993) Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A, *Immunogenetics*, 38, 323-331
- NEHEMIAH, J. L., SCHNITZER, J. A., SCHULMAN, H., NOVIKOFF, A. B. (1981) Human chorionic trophoblasts, decidual cells, and macrophages: a histochemical and electron microscopic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140,261-268
- O'BRIEN M., MCCARTHY T., JENKINS D., PAUL P., DAUSSET J., CAROSELLA E.D., MOREAU P. (2001) Altered HLA-G Transcription In Pre-Eclampsia is Associated with Allele Specific Inheritance: Possible Role of The HLA-G Gene in Suseptibility to The Disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 58.1943,
- ONNO M, PANGAULT C, LE FRIEC G, GUILLOUX V, ANDRE P AND FAUCHET R (2000) Modulation of HLA-G antigen expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 164,6426–6434.
- ÖNER C. (2002) *Genetik kavramlar*. Ankara Palme Yayıncılık.
- PARHAM P. (1996) Immunology: Keeping Mother at Bay. *Curr. Biol.* 6, 638-641
- PAUL P, ROUASS-FREIS N, KHALIL-DAHER I, MOREAU P, TITEAU B, LE GAL FA, AVRIL MF, DAUSSET J, GUILLET JG AND CAROSELLA ED (1998) HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95,4510–4515.

- PENDE, D., SIVORI, S., ACCAME, L., PARETI, L., FALCO, M., GERAGHTY, D., LE BOUTEILLER, P., MORETTA, L., MORETTA, A. (1997) HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 27,1875-1880
- PEREZ-VILLAR, J. J., MELERO, I., NAVARRO, F., CARRETERO, M., BELLON, T., LLANO, M., COLONNA, M., GERAGHTY, D. E., LOPEZ-BOTET, M. (1997) The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J. Immunol.* 158,5736-5743
- PETROFF, M. G., CHEN, L., PHILLIPS, T. A., AZZOLA, D., SEDLMAYR, P., HUNT, J. S. (2003) B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.* 68,1496-1504
- POLANCZYK, M. J., CARSON, B. D., SUBRAMANIAN, S., AFENTOULIS, M., VANDENBARK, A. A., ZIEGLER, S. F., OFFNER, H. (2004) Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J. Immunol.* 173,2227-2230
- RAJAGOPALAN S AND LONG EO (1999) A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189,1093–1100
- RAJAGOPALAN, S., FU, J., LONG, E. O. (2001) Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J. Immunol.* 167,1877-1881
- READ, S., POWRIE, F. (2001) CD4(+) regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13,644-649
- REBMANN, V., PFEIFFER, K., PASSLER, M., FERRONE, S., MAIER, S., WEISS, E., GROSSE-WILDE, H. (1999) Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 53,14-22
- REID MST. Striking a balance in maternal immune response to infection. *Lancet* 1998;351:1670-1671.
- REINHARD G, NOLL A, SCLEBUSCH H et al. Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:933-938.
- RITEAU B, ROUAS-FREISS N, MENIER C, PAUL P, DAUSSET J AND CAROSELLA ED (2001) HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 166,5018–5026
- RIZZO, R. et al. (2007) HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Hum. Immunol.* 68, 244–250
- ROBINSON GE., STEWART DE: (1994-1997) *Infertility and New Reproductive Technologies. Review of Psychiatry*, Ch.11, vol 14
- ROUAS-FREISS, N. et al. (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11520–11525
- SACKS G, SARGENT I, Redman Ch. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999; 20.114-118.

- SAKAGUCHI, S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101,455-458
- SAMBROOK J, FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Pres. Bouteiller P vr Mallet V,(1997) HLA-G and pregnancy. *Reviews of Reproduction* 2, 7-1
- SARZOTTI M, ROBBINS DS; HOFFMAN PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996;271:1726-1728.
- SIPAK-SZMIGIEL O, RONIN-WALKNOWSKA E, CYBULSKI C, PLONKA T, LUBINSKI J (2007) Antigens HLA-G, sHLA- G and sHLA- class I in reproductive failure *Folia Histochemica Et Cytobiologica* Vol. 45 pp. 137-141
- SMITH CG, ASCH RH (1987) Drug Abuse and Reproduction. *Fertil Steril* 48: 355
- SODERSTROM, K., CORLISS, B., LANIER, L. L., PHILLIPS, J. H. (1997) CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J. Immunol.* 159,1072-1075
- SOLIER, C., AGUERRE-GIRR, M., LENFANT, F., CAMPAN, A., BERREBI, A., REBMANN, V., GROSSE-WILDE, H., LE BOUTEILLER, P. (2002) Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur. J. Immunol.* 32,3576-3586
- SPEROFF L, GLASS N. H, KASE R. G. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 6th Edition.* 1999:84, 171, 213, 236, 1013, 1075, 1097, 1133.
- STARKEY, P. M., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W. (1988) Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 65,129-134
- STEPTOE PC., EDWARDS Rg.(1989) Infertility by choice or by nature. *Can. J.Psychiatry* 34.866-871
- STILLMAN RJ, ROSENBERG MJ, SACHS BP (1986). Smoking and Reproduction. *Fertil Steril* 46: 545
- STRIRAT GM. Pregnancy and immunity. *Brit Med J* 1994;308:1385-1386.
- ŞAHMAY S.(1995) İnfertilitede ovulatuvar faktör. *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite.* Ertüngealp ed. s.:9
- VAN DER MEER, A., LUKASSEN, H. G., VAN LIEROP, M. J., WIJNANDS, F., MOSSELMAN, S., BRAAT, D. D., JOOSTEN, I. (2004) Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol. Hum. Reprod.* 10,189-195
- VINCE, G. S., JOHNSON, P. M. (1996) Immunobiology of human uteroplacental macrophages—friend and foe?. *Placenta* 17,191-199
- VINCE, G. S., STARKEY, P. M., JACKSON, M. C., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W. (1990) Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J. Immunol. Methods* 132,181-189

- WATANABE M, LWATANI Y, KANEDA T et al. Changes in T, B and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:368-377.
- WEGMANN, T. G., LIN, H., GUILBERT, L., MOSMANN, T. R. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?. *Immunol. Today* 14,353-356
- WESTROM L (1975) Effect of acut pelvic disease on infertility. *Am. J. Obst Gynecol* 121:707
- WHITEFORD LM., GONZALES L. (1995). Stigma: the hidden burden of infertility. *Soc. Sci. Med.* 40(1): 27-36
- WIENDL H, MITSDOERFFER M, HOFMEISTER V, WISCHHUSEN J, BORNEMANN A, MEYERMANN R, WEISS EH, MELMES A AND WELLER M (2002) A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168,4772–4780.
- WILSON CB, WESTALL J, JOHNSTON L et al. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. *J Clin Invest* 1986;77:860-865
- XUE S, YANG J, YAO F, XU L, FAN L.(2007) Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 69 Suppl 1.153-5.
- TRIPATHI P, ABBAS A, NAIK S, AGRAWAL S.(2004) Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 64: 706–10.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler:

Adı Soyadı : Pınar Atakul
 Doğum Yeri : Ankara
 Uyuğu : T.C.
 Doğum Tarihi : 29.04.1976
 Medeni Hali : Evli
 İletişim Adresi: Ş. Alaattin Saraç Yakupoğlu Sk. 50/B Blok Güneş Sit. No:37
 Dikmen/ Ankara
 Telefon : 312 4810870

Eğitimi:

1994-1999 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
1990-1994 Ankara Atatürk Anadolu Öğretmen Lisesi/Ankara Tınaztepe Lisesi

Kurslar ve Eğitimler:

2000 Medi-Cult yıllık toplantısı, Floransa/İtalya
 ESHRE Kongresi, Bologna/İtalya
 Research Instruments Mikromanipulator Eğitimi, Londra/İngiltere
2001 Becton Dickinson 4 renkli Flowsitometri Cihazı Eğitimi, Milano/İtalya
 XVI. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Antalya
 Uygulamalı Flowsitometri Eğitimi-VII, Detam/İstanbul
2002 BD-Biosciences Ürünleri Ve Satış Stratejileri Eğitimi Heidelberg/Almanya
 Uygulamalı Flowsitometri Eğitimi-VIII, Detam/İstanbul
 Hematopoietik Kök Hücre Naklinde Son Gelişmeler, GATA/Ankara
 Becton Dickinson FacsCalibur Flowsitometri Cihazı Eğitimi,
 Heidelberg/Almanya
2004 Uygulamalı Merkezi Sterilizasyon Eğitimi, Amerikan Has./İstanbul
2008 Biotronik Girişimsel Kardiyoloji ve Radyoloji Ürün Eğitimi, İstanbul
 Uluslararası Girişimsel Kardiyoloji Kongresi, İzmir