

SERUM HLA-G SEVİYELERİ İLE SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİNİN İLİŞKİSİ

Bilkay BAŞTÜRK¹, Ayşegül HABERAL²

Amaç: Bu çalışmada immünotolerjenik etkisi olduğu bilinen HLA-G molekülünün serum seviyesi ile sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

Hasta ve Metod: İlk karaciğer naklerini olmuş 55 hastadan alınan kan örneklerinden ayrılan serumlardan sHLA-G seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Araştırılan TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, IFN- γ gen polimorfizmlerinin belirlenebilmesi için PCR-SSP yöntemi kullanıldı.

Sonuçlar: Hastaların sitokin gen polimorfizmlerine göre serum sHLA-G seviyesi yüksek olan hasta dağılımı, TNF-alpha -308 GG %15.5, -308 G/A, A/A %20, TGF-beta kodon 10-25 T/T-G/G, T/C-G/G %16.6, kodon 10-25 T/C-G/C, C/C-G/G, T/T-G/C %16.0, IL-10 -1082 GCC/GCC %30, -1082 GCC/ACC, GCC/ATA %13, -1082 ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA %13.6, IL-6 -174 G/G, G/C %18.3, IFN-gamma +874 T/T %18.1, +874 T/A %11.7, +874 AA %15.3 olarak bulundu.

Yorum: İmmün yanıtın gelişmesini ve etki yönünün belirlenmesini sağlayan sitokinler bir çok molekülün de ekspresyonunda ve sekresyonunda rol oynarlar. Sitokinlerin üretiminde etkileri olan gen polimorfizmlerinin de hastalıkların oluşmasında ve progresyonunda farklılıklara neden olduğu bilinmektedir. Çalışma sonuçlarına göre HLA-G artışına neden olan IL-10'un yüksek salınımı ile uyumlu haplotipi taşıyan hastaların %30'unda saptanan sHLA-G seviyesindeki yükseklik polimorfik yapıardan kaynaklanan bireysel farklılıklara bir örnek oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: HLA-G, sitokin, gen polimorfizmi,

ASSOCIATION BETWEEN SERUM HLA-G LEVELS AND CYTOKINE GENE POLYMORPHISM

Purpose: To investigate if there is an association between cytokine gene polymorphism and serum level of HLA-G, which is known to be an immunotolerogenic molecule.

Patients and Methods: Fifty-five patients receiving primary liver transplants were enrolled in this study. HLA-G serum levels were determined by ELISA method. All genotyping (TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, IFN- γ) experiments were performed using sequence-specific primers PCR (PCR-SSP).

Results: According to the cytokine gene polymorphisms of the patients, the frequencies of high sHLA-G levels in patients were as follows: TNF-alpha-308 GG is 15.5%, -308 G/A, A/A is 20%; TGF-beta codon 10-25 T/T-G/G, T/C-G/G is 16.6%; T/C-G/C, C/C-G/G, T/T-G/C is 16.0%; IL-10-1082 GCC/GCC is 30%, -1082 GCC/ACC, GCC/ATA is 13%; ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA is 13.6%; IL-6 -174 G/G, G/C is 18.3%; IFN-gamma +874 T/T is 18.1%, +874 T/A 11.7, +874 AA is 15.3%.

Conclusion: Cytokines, which support the development of immune response and help direct its effects, also play a role in the expression and secretion of many molecules. It is known that gene polymorphisms that also affect cytokine production cause changes in the development and progression of many diseases. The results of our study demonstrated that 30% of patients who carried a haplotype compatible with high IL-10 secretion leading to HLA-G elevation had high HLA-G levels, which was an example of individual differences due to polymorphic structures.

Key Words: HLA-G, cytokine, gene, polymorphism.

GİRİŞ

“İnsan Lökosit Antigen-G” (HLA-G), klasik HLA klas I moleküllerine kıyasla daha az polimorfizm gösteren klasik olmayan bir HLA molekülüdür. Bilinen 15 farklı alleli ve 4 tanesi membrana bağlı, 3 tanesi de çözümlenir şekilde olmak üzere toplam 7 izoformu mevcuttur (1-4).

HLA-G1-G4 izoformlarının, inhibitör etkiden sorumlu olduğu ve bu etkisinin immünglobülin benzeri transkript-2 (Ig Like Transcript-2; ILT-2), Ig benzeri Transcript-4 (ILT-4), iki ilmekli, uzun stoplazmik kuyruklu öldürücü hücre Ig benzeri reseptör-4 (killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4; KIR2DL4) inhibitör doğal öldürücü hücre reseptörleri ile bağlanarak gösterdiği bilinmektedir (5).

Bunun yanı sıra HLA-G'nin CD8 yüzey molekülü taşıyan hücrelere bağlandıktan sonra Fas-Fas ligand bağımlı bir mekanizma ile CD8+ T hücrelerinin ve NK hücrelerinin apoptozunu indüklediği ve bu hücrelerin hedefi olan hücrelerin yüzeyinde HLA-G ekspresyonu varsa sitolitik fonksiyonlarının direk olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (6-8).

HLA-G molekülünün, ilk tanımlandığı dönemde bazı trofoblastik hücrelerde eksprese edildiğinin gösterilmesi ve fetomaternal bileşkede fazla bulunması nedeniyle fetusa karşı annede oluşması beklenen immün yanıtın baskılanmasında anahtar rol oynayabileceği düşünülmüştür. İmmün sistemden korunmuş bölgelerde sürekli ekspresyonunun belirlenmesi, immüno-inhibitör etkisiyle ilgili çalışmalara ağırlık verilmesine neden olmuştur (9-11).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda otoimmün miyopati modelinde HLA-G'nin kas hücrelerini lizisten koruduğu (12), akciğer kanseri olan hastalarda serum HLA-G düzeyinin yüksekliği ile ileri evre ilişkisi bulunduğu gösterilmiştir (13).

Karaciğer ve kalp nakli ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda, serum sHLA-G düzeyleri ve dokuda ekspresyonu ile greftin reddi arasında da ilişki olabileceği bildirilmiştir (14-16). HLA-G molekülünün, nakil sonrasında kalp ve karaciğer doku biyopsilerinde ekspresyonunun gösterilmesi, uygulanan tedaviye ve mikro çevre uyarılarına bağlı olarak ekspresyonunun artabileceğini göstermiştir (16, 17). Bu uyarıların en önemlileri immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan sitokinlerdir. Polimorfik gen yapılarından kaynaklanan bireysel farklılıklar sitokinlerin sentezinde etkili olduğu bilinmektedir. Genlerin 5' ve 3' ucundaki regülatuar bölgelerinde veya intronlarda oluşan polimorfizmlerin transkripsiyonu belirgin ölçüde etkilediği ve gen polimorfizmi ile sitokin sentez düzeyi arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir (18, 19).

Çalışma immünomodülatör etkili HLA-G molekülünün serum seviyesi ile sitokin gen polimorfizmi ilişkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı

² Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

Tablo 1: Sitokin gen polimorfizmleri ve ilişkili oldukları fenotipik özellik

Sitokin gen polimorfizmi	Genotip	Fenotipik özellik
TNF- α (-308)	G/A, A/A G/G	Yüksek Düşük
TGF- β 1 (kodon 10-25)	T/T-G/G, T/C-G/G T/C-G/C, C/C-G/G, T/T-G/C C/C-G/C, C/C-C/C, T/T-C/C, T/C-C/C	Yüksek İlımlı Düşük
IL-10 (-1082)	GCC/GCC GCC/ACC, GCC/ATA ACC/ACC, ACC/ATA ATA/ATA	Yüksek İlımlı Düşük
IL-6 (-174)	G/G, G/C C/C	Yüksek Düşük
IFN- γ (+874)	T/T T/A A/A	Yüksek İlımlı Düşük

HASTA VE METOD

Karaciğer nakli sonrası yapılan doku biyopsilerinde HLA-G ekspresyonunun gösterilmesi ve bu hasta grubunda serum HLA-G seviyesinin arttığı bilinmesi nedeni ile karaciğer nakli olmuş 55 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve etik kurul onayı alınmıştır. Serum sHLA-G seviyelerinin belirlenmesi amacıyla, hastalardan nakil sonrası alınan kan örneklerinden ayrılan serumlar -80°C da ölçüm yapılana kadar saklanmış, sHLA-G seviyeleri ELISA (EXBIO Prague) yöntemi ile ölçülmüştür. Hasta grubundan, etilen diamin tetra asetik asid (EDTA) içeren tüplere alınan 3ml. venöz kan örneğinden, NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Germany) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıp, elde edilen DNA örnekleri, araştırılan polimorfizm bölgelerinin saptanması amacıyla, sitokin gen tiplendirme kiti (One lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) kullanılarak (Tablo1), polimerize zincir reaksiyonu (PCR) metodu ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri ethidyum bromid ile boyanarak jel elektroforez yöntemi ile ultraviyole ışık altında görüntülenerek belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Hastaların sitokin gen polimorfizmleri ile serum HLA-G düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, TNF- α için düşük salınımlı uyumlu polimorfik yapıda sHLA-G yüksekliği %15.5, düşük salınımlı uyumlu polimorfik yapıda %20, TGF- β için yüksek salınımlı uyumlu polimorfik yapılarda sHLA-G yüksekliği %16.6, ılımlı salınımlı uyumlu polimorfik yapılarda %16, IL-10 yüksek salınımlı uyumlu yapılarda %30, ılımlı salınımlı uyumlu yapılarda %13, düşük salınımlı uyumlu yapılarda %13.6, IL-6'nın yüksek salınımlı uyumlu yapılarda %18.3, IFN-gama için yüksek salınımlı uyumlu yapılarda %18.1, ılımlı salınımlı uyumlu yapılarda %11.7, düşük salınımlı uyumlu yapılarda %15.3 oranında dağılım olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Otokrin, parakrin ve endokrin yolla etkilerini gösteren sitokinlerin salınımını etkileyen faktörlerden biri olan sitokin gen polimorfizmleri ile bir çok hastalık arasında ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (20-22). Bizim çalışmamızda IL-10 yüksek salınımlı uyumlu polimorfik bölgeleri olan hastaların %30'unda serum HLA-G seviyesi yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda diğer sitokin genlerindeki polimorfik bölgelerle serum HLA-G seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmasına karşın yapılan çalışmalarla IFN- α , IFN-gama ve IFN-beta etkisi ile HLA-G ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (23, 24). Daha önce yaptığımız çalışma sonuçlarımıza göre, karaciğer nakli olmuş ve aynı tedaviyi alan hastaların serum HLA-G seviyesi ile karaciğer fonksiyon testleri arasında ilişki olduğu ve serum HLA-G seviyesi 30 U/ml ve üzerinde olanların karaciğer fonksiyon testlerinin iyi olduğu belirlenmiştir (25). Bu çalışmamızda da serum HLA-G seviyesi 30 U/ml üzerinde olan değerler yüksek olarak kabul edilmiştir. Bu değer ile sitokin gen polimorfizm ilişkilerine bakıldığında sadece IL-10 için yüksek salınımlı uyumlu polimorfik bölgeye sahip hastaların %30'unda serum HLA-G düzeyinin yüksek olduğu diğer gruplar arasında bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Pleotropik etkili IL-10, Th1 hücrelerinde inflamatuvar sitokin sentezinin üretimini azaltıcı yönde etki ederken, makrofajların doğal öldürücü hücrelerin ve periferik kanda mononükleer hücrelerin de etkilerini baskılar (26).

IL-10 etkisi ile HLA-G transkripsiyonunun ve protein ekspresyonunun, trofoblast kültüründe ve periferik kan mononükleer hücrelerinde, arttığı ve monositlerin yüzeyindeki MHC sınıf I ve sınıf II molekül ekspresyonun da azaldığı Moreau ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (27). Monositlerde IL-10 etkisi ile HLA-G ekspresyonunun artması HLA-G'nin bilinen inhibitör etkileri ile immün yanıtı baskılanmasına neden olmaktadır.

Teşekkür: Bu çalışma Başkent Üniversitesi tarafından KA 04/146 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yazışma Adresi

Dr. Bilkay Baştürk

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji

AD 06500 Beşevler ANKARA

Tel: 202 4743

e-posta: bilkay@gazi.edu.tr

KAYNAKLAR

1. Urošević M., Dummer R. HLA-G - An Ace Up the Sleeve? *ASHI Quarterly*, Third Quarter, 2002; 106-109.
2. Carosella ED, Rouas Freiss N, Paul P, ve ark. HLA-G: A Tolerance Molecule from the Major Histocompatibility Complex. *Immunol Today*, 1999; 20: 60-62.
3. Carosella ED, Paul P, Moreau P, ve ark. HLA-G and -E: Fundamental and Physiopathological Aspects. *Immunol Today*, 2000; 21: 532-534.
4. Bainbridge D, Ellis S, Le Bouteiller P, ve ark. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol*, 2001; 22: 548-552.
5. Le Maoult, Zafaranloo K, Le Danff C, ve ark. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *The FASEB Journal*, 2005; 19: 662-664.
6. Contini P, Ghio M, Poggi A. 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*, 2003; 33: 125-34.
7. Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C. Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J Reprod Immunol*, 1999; 43: 175-182.
8. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C. HLA-G mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*, 1999; 11: 1351-1356.
9. Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, ve ark. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*, 1986; 59: 595-601.
10. Ober C. Immunogenetics '98 HLA and pregnancy: The paradox of fetal allograft. *Am J Hum Genet*, 1998; 62: 1-5.
11. Le Bouteiller P, Solier C. Is antigen presentation the primary function of HLA-G? *Microbes Infect*, 2001; 3: 323-332.
12. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, ve ark. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain*, 2003; 126: 176-185.
13. Urošević M, Kurrer M O, Kamarashev J, ve ark. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol*, 2001; 159: 817.
14. Basturk B, Karakayali F, Emiroglu R, ve ark. Human Leukocyte Antigen-G, a New Parameter in the Follow-up of Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 2006; 38: 571-574.
15. Creput C, Le Fricc G, Bahri R, ve ark. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol*. 2003; 64: 1033-1038.
16. Lila N, Amrein C, Guillemain R, ve ark. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002; 105: 1949-54.
17. Creput C, Durrbach A, Menier C, ve ark. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J. Hepatol*. 2003; 4: 587-594.
18. Leigh J. Keen. The extend analysis of cytokine and receptor gene polymorphism. *Transplant Immunology*, 2002; 10: 143-46.
19. Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Current Opinion Immunology*, 2001; 13: 572-76.
20. Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, ve ark. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 144-50.
21. Basturk B, Yavascaoglu I, Vuruskan H, ve ark. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine*. 2005; 30: 41-45.
22. Balasubramanian SP, Azmy IA, Higham SE, ve ark. Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review. *BMC Cancer*. 2006; 14: 188.
23. Yung Y, Geraghty DE, Hunt JS. Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines. *J Reprod Immunol*. 1995; 29: 179-95.
24. Chu W, Yang Y, Geraghty DE, Hunt JS. Interferons enhance HLA-G mRNA and protein in transfected mouse fibroblasts. *J Reprod Immunol*. 1999; 42: 1-15.
25. Basturk B, Karakayali F, Emiroğlu R, ve ark. Human Leukocyte Antigen G; a new Parameter in the Follow up of Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2006; 38: 571-574.
26. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, ve ark. IL-10 inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology Letters*. 2003; 86: 123-129.
27. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, ve ark. IL-10 Selectively Induces HLA-G Expression in Human Trophoblasts and Monocytes. *International Immunology*. 1999; 11: 803-811.