

Non-Klasik HLA Molekülleri ve NK Hücreleri

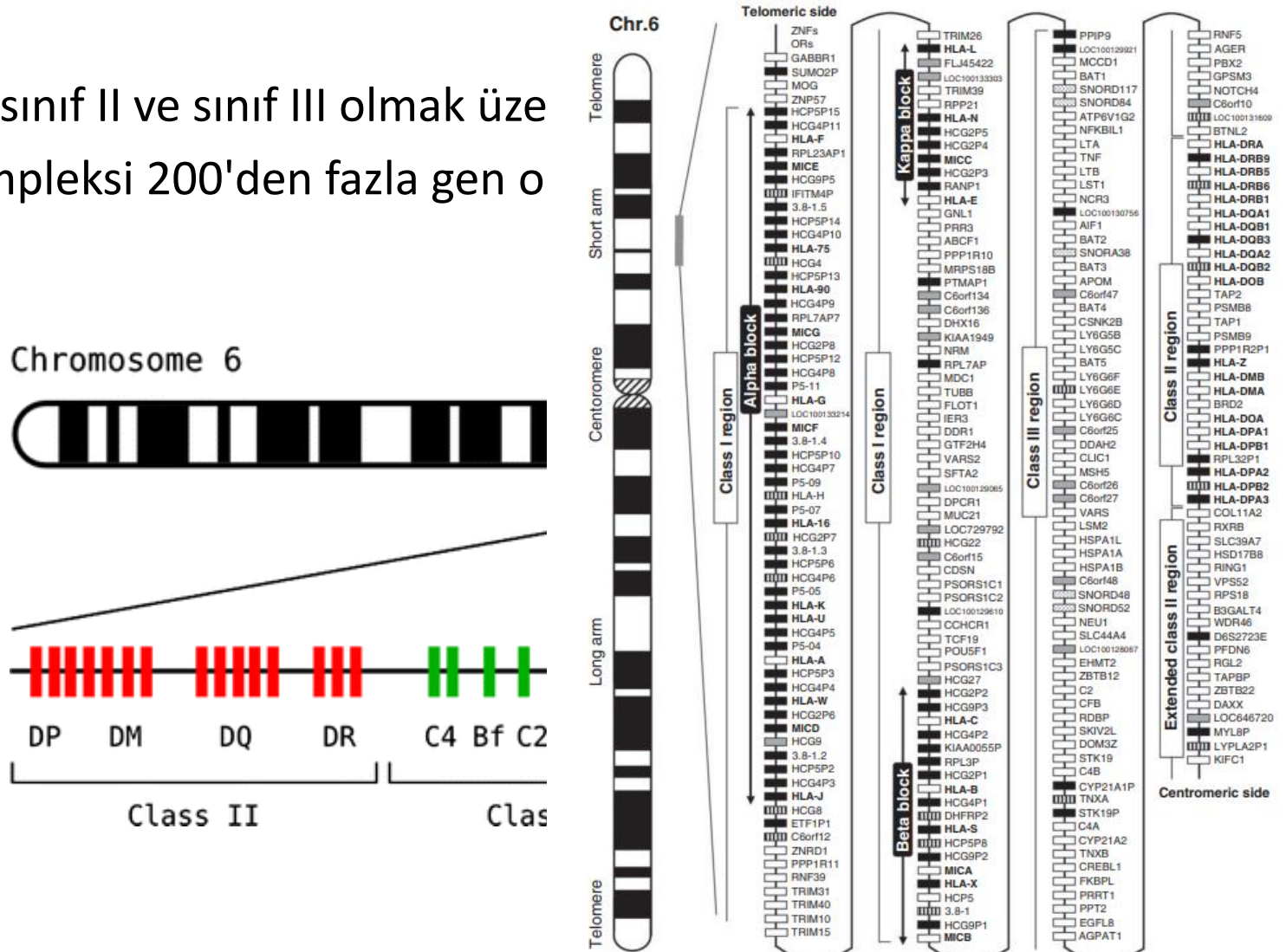
DOÇ.DR. JÜLİDE TOZKIR

SUNUM PLANI

- Klasik ve Non-Klasik HLA Moleküllerin Benzerlikleri ve Farkları
- Non-Klasik HLA ve NK Hücre İlişkisi
- HLA-E
- HLA-F
- HLA-G
- Psödogenler önemli olabilir mi?
- Tartışma ve Sonuç

HLA Sistemi

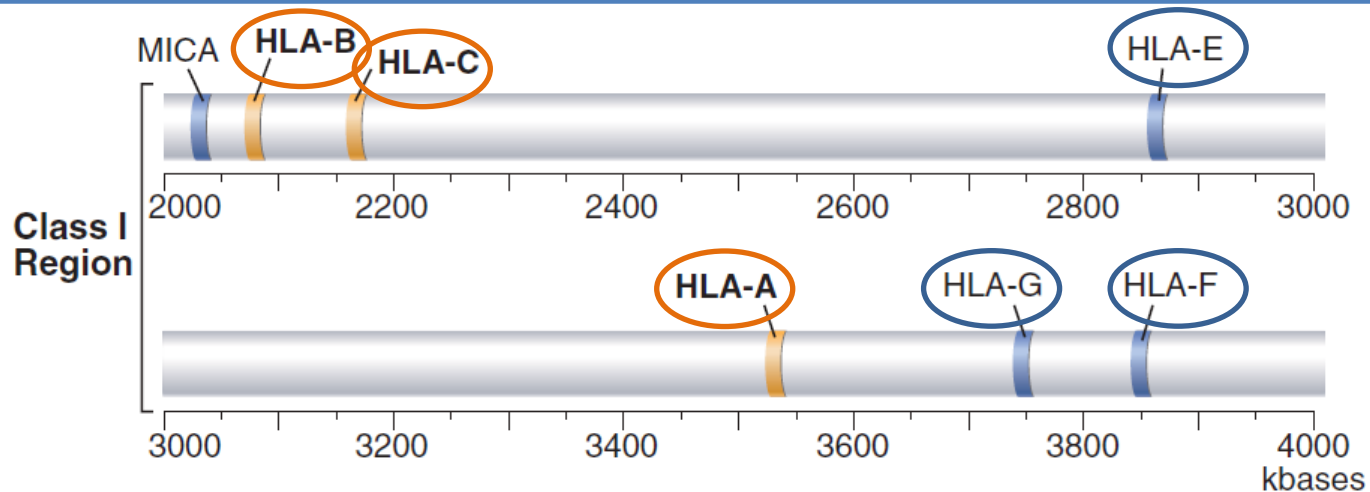
- Sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere
- Bu kompleksi 200'den fazla gen o



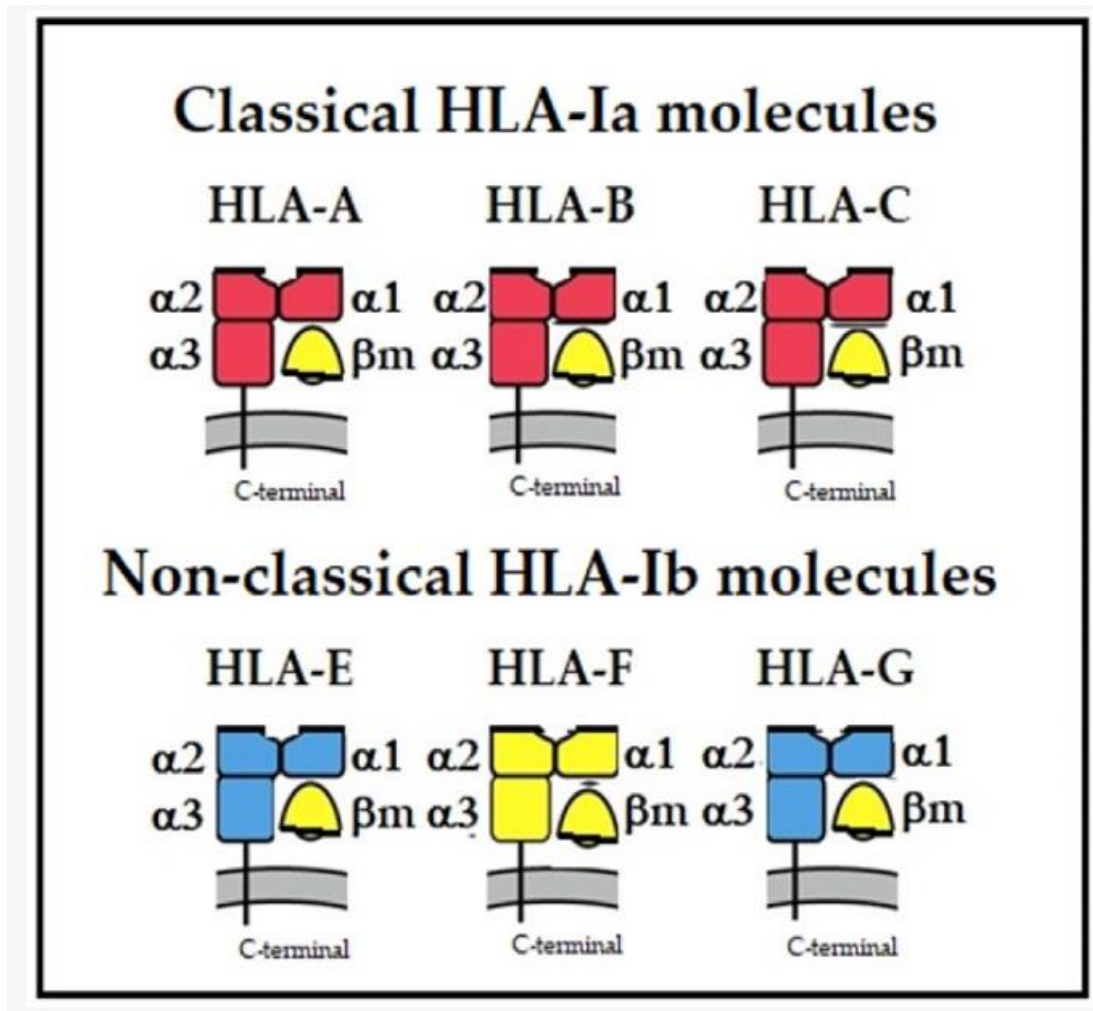
- HLA Sınıf I bölgesinden üretilen
- HLA-A, -B, -C molekülleri klasik,
- HLA-E, -F, -G molekülleri non-klasik olarak gruplandırılmaktadır.

Klasik HLA Sınıf I Molekülleri

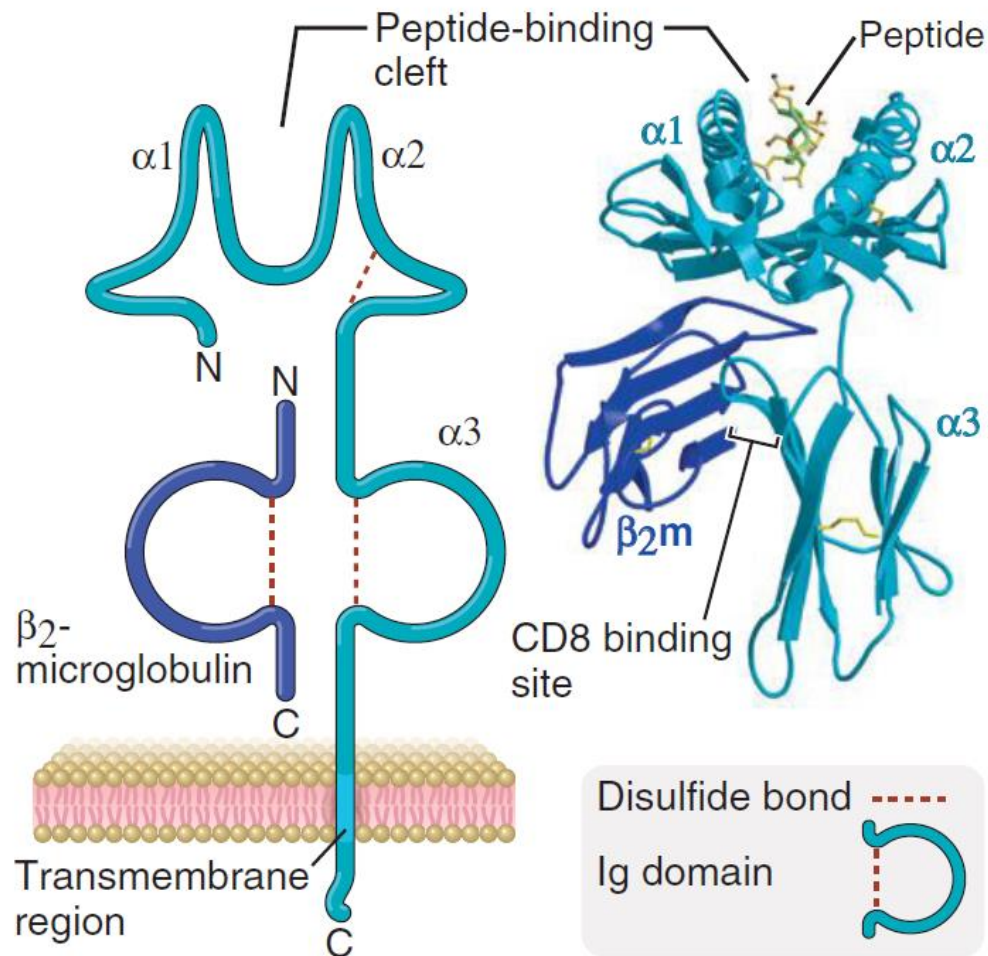
Non-Klasik HLA Sınıf I Molekülleri



Klasik ve non-klasik HLA molekülleri yapısal olarak birbirine benzerdir.



Klasik ve non-klasik HLA Sınıf I molekülleri hücre içi antijenleri sunma yeteneğine sahiptirler.



Klasik ve Non-Klasik HLA Arasındaki Farklar

FARKLILIK	KLASİK HLA	NON-KLASİK HLA
Polimorfizm	Çok polimorfik	Az polimorfik
İmmün Sistem	Kazanılmış immün sistem	Doğal immün sistem
Ligand spesifik hücre (Çoğunlukla !)	T hücre	NK hücre
İşlevsel Etki (Çoğunlukla !)	Aktivasyon	İnhibisyon

Polimorfizm

Bu bölge içerisinde
psödogenler de
bulunmaktadır.

GT/HLA KIR MHC NHKIR HPA ESTDAB

ABOUT / STATISTICS

		C	E	F	G
Alleles	9877	8361	353	91	160
Proteins	5883	4604	140	17	50
Nulls	348	376	10	2	6

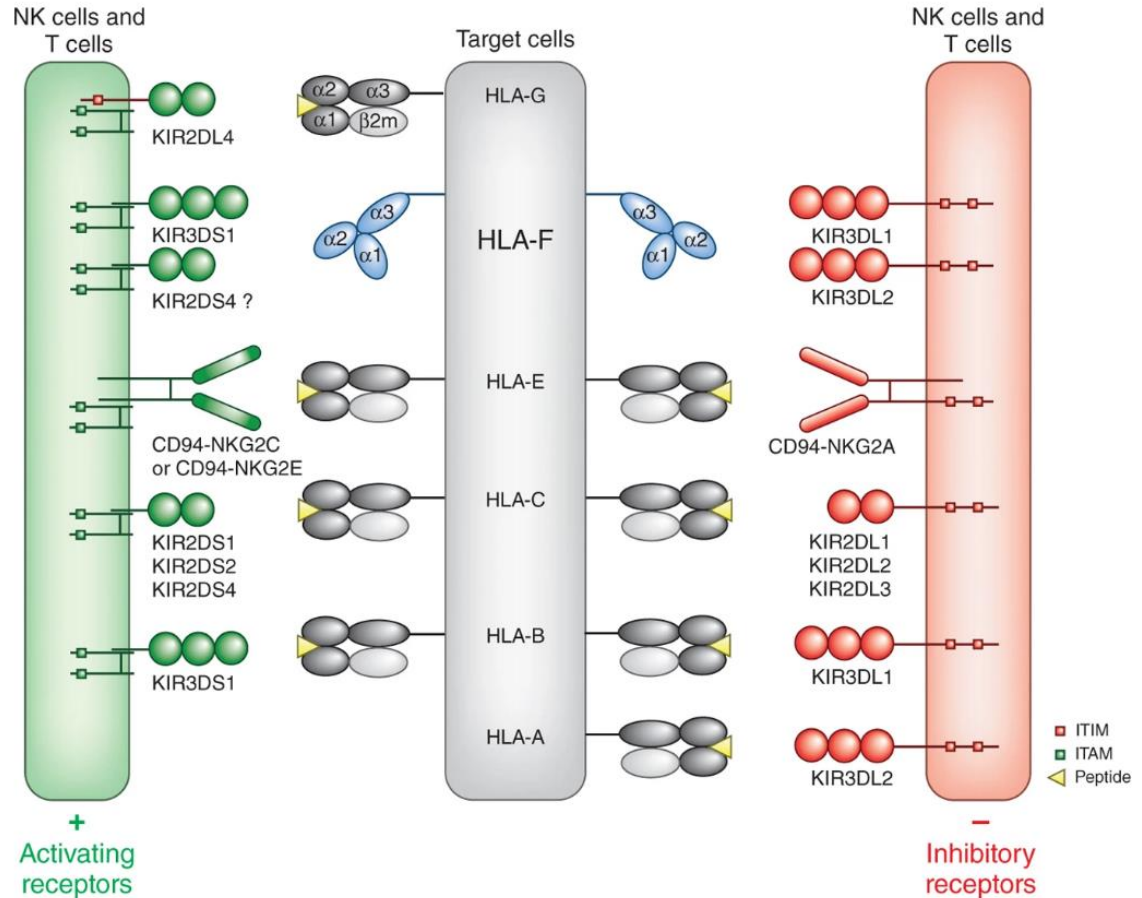
HLA class I - Pseudogenes

Gene	H	J	K	L	N	P	S	T	U	V	W	Y
Alleles	72	33	7	6	5	5	7	9	7	4	13	3
Proteins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nulls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Klasik HLA molekülleri
polimorfiktir
Non-klasik HLA
molekülleri daha az
polimorfiktir.

Non-Klasik HLA molekülleri başlıca NK hücreler üzerindeki reseptörlere bağlanır.

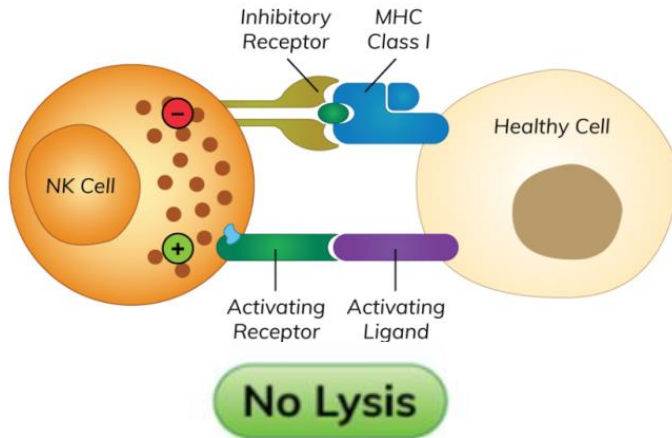
- NK hücreler, aktive edici ve inhibe edici geniş bir reseptör repertuvarına sahiptir.
- NK hücre reseptör repertuarından alınan sinyallerin kombinasyonu aktivasyonu veya inhibisyonu belirler.



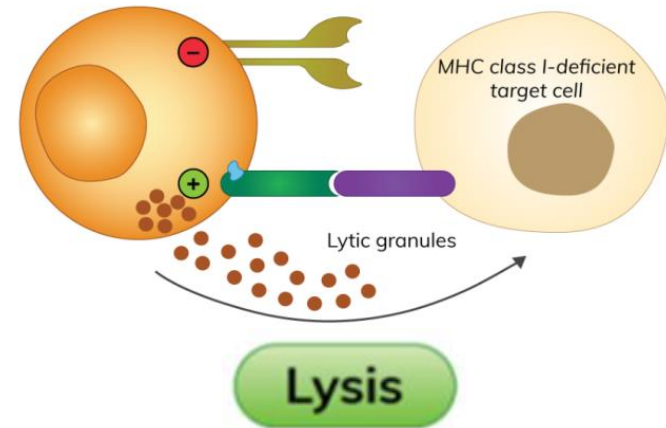
NK reseptörlerinin ligandları ile etkileşimi sitolitik aktiviteyi belirler.

İnhibitör ve aktivatör sinyallerin dengeli olması

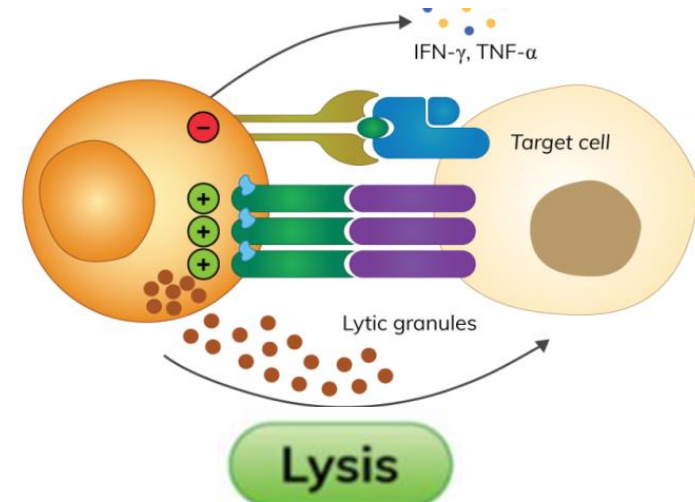
Normal cells



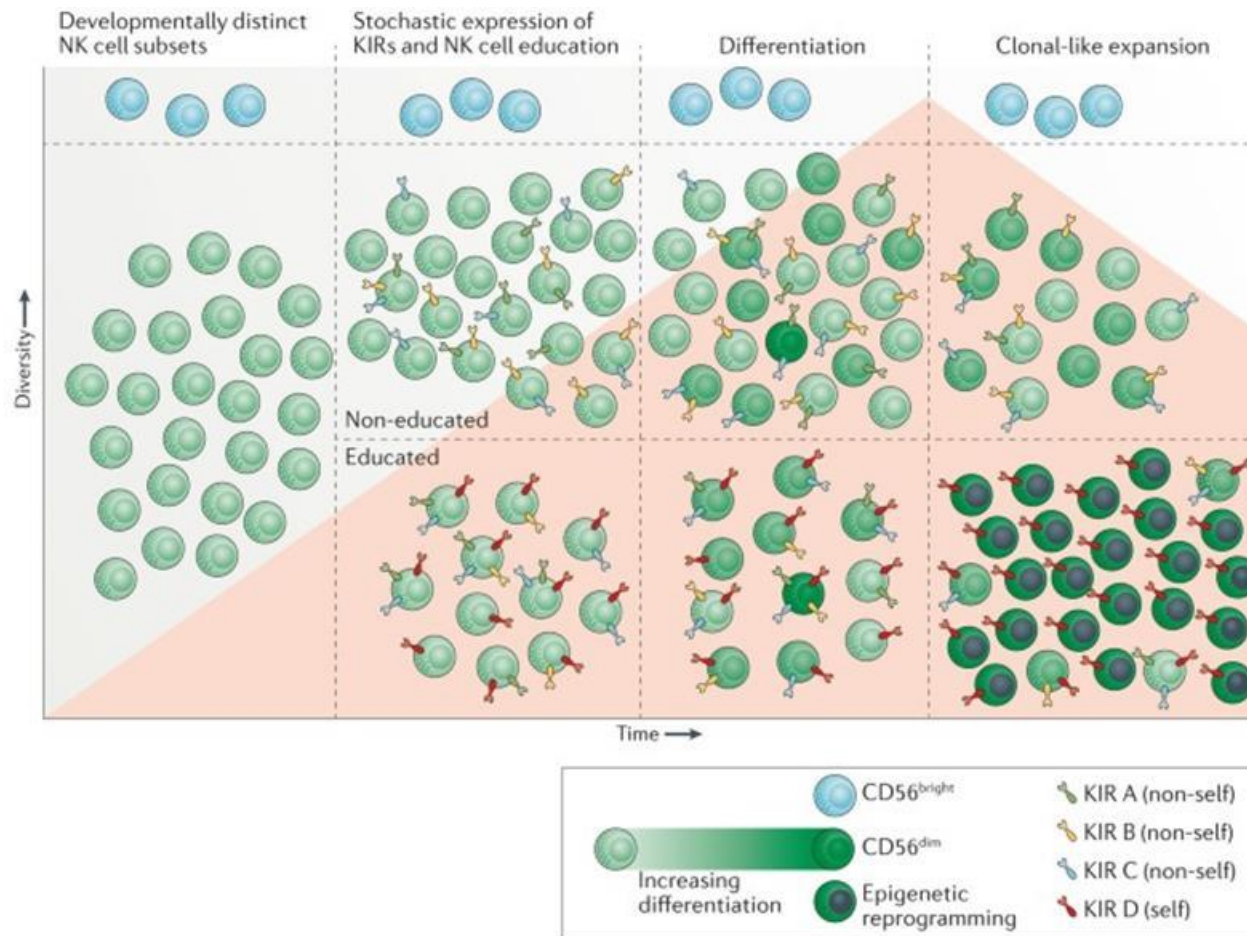
İnhibitör sinyallerin olmaması



Aktivator sinyallerin fazla olması

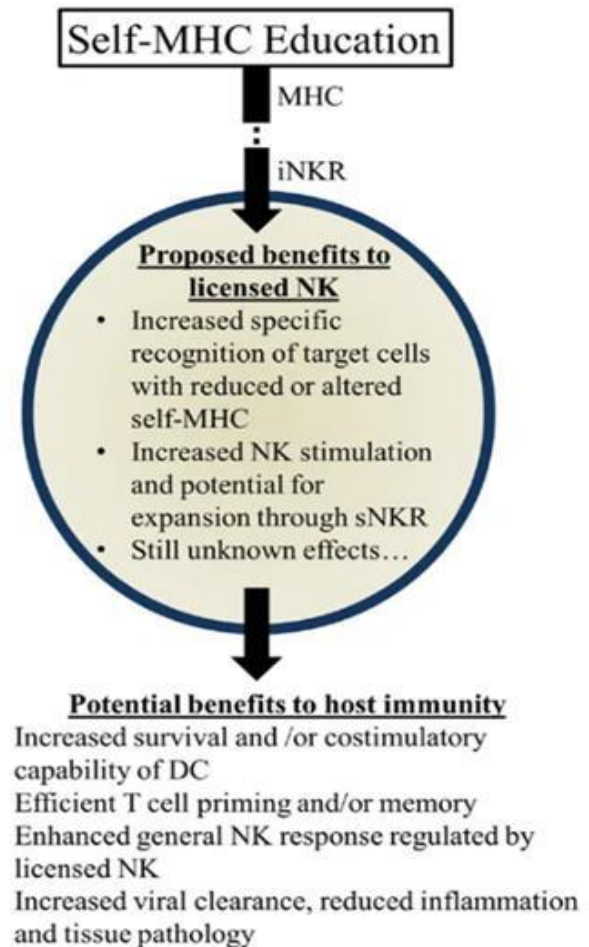


Fenotipik olarak 6000-30.000 farklı NK hücre alt kümesi olabileceği ortaya konmuştur.



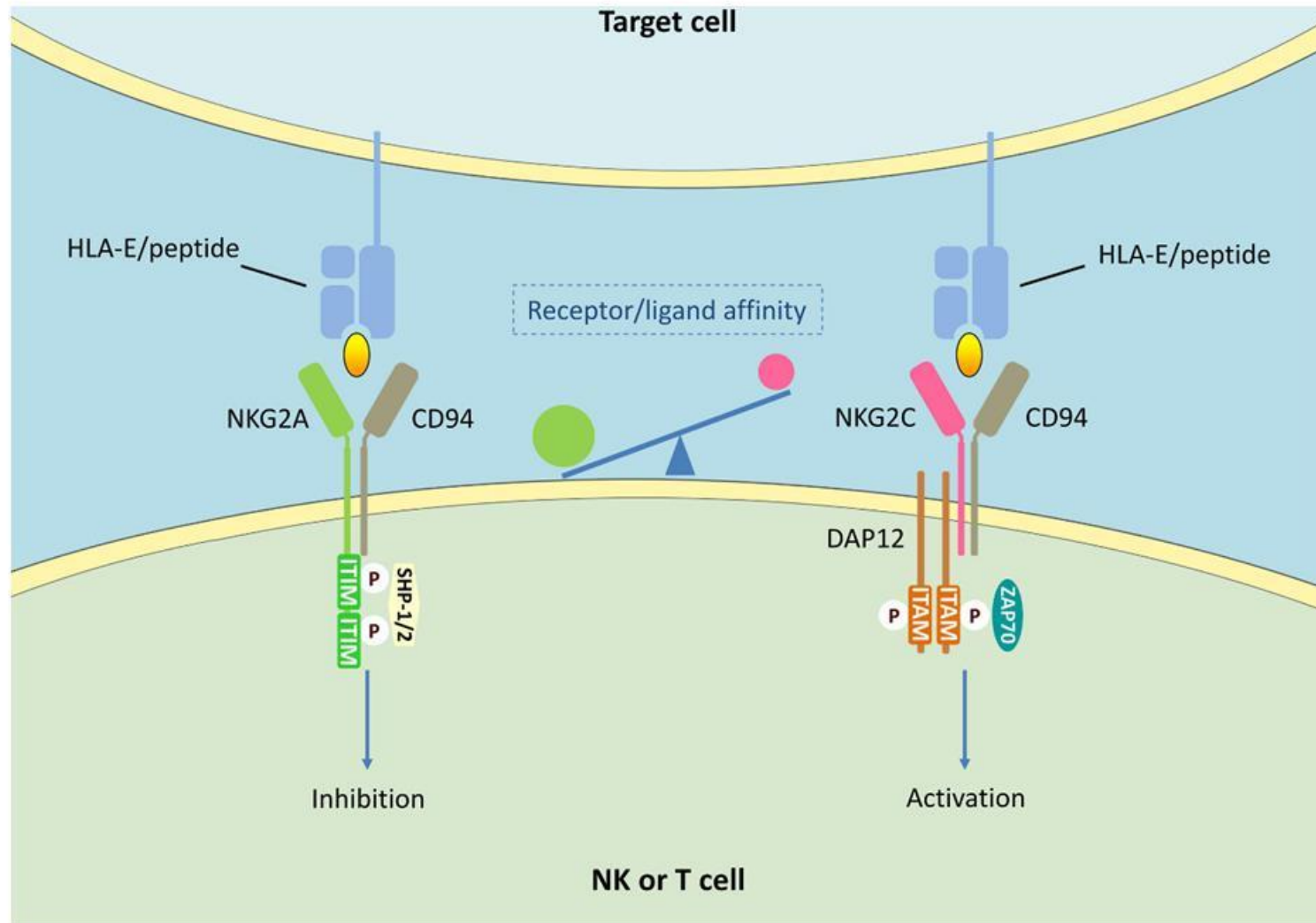
Non-Klasik HLA molekülüleri NK hücrelerinin lisanslanmasında ve fonksiyonunda önemlidir.

NK lisanslamasını
klasik ve non-klasik HLA
moleküllerine özgü
reseptörler gerçekleştirir.



HLA-E

HLA-E



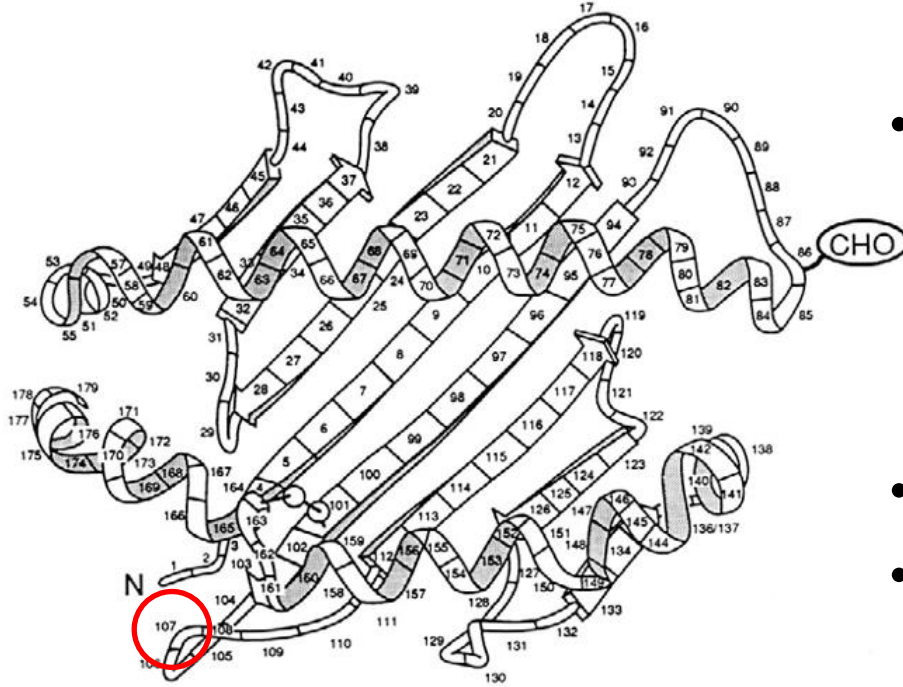
CD94/NKG2 İfadesi

- CD94/NKG2A, insan periferik kanında NK hücrelerinin yaklaşık %50'sinde ve CD8+ T hücrelerinin %5'inde ifade edilir.
- CD94/NKG2C ifadesi CMV gibi koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterir.
 - CMV seronegatif -->%1-22
 - CMV seropozitif --> %23-73
- Bu iki reseptör arasında HLA-E'ye bağlanma açısından fark vardır.
 - CD94/NKG2A yüksek affinite ile bağlanır.
 - CD94/NKG2C daha düşük affiniteye ile bağlanır.

HLA-E ve NK Fonksiyonları

- CD94/NKG2A NK hücrelerinin lisanslanmasında önemlidir.
- NKG2A lisanslı NK hücreleri HLA-E negatif hedef hücrelere karşı güçlü yanıtlara aracılık eder.
- NKG2A, sağlıklı hücreler için NK hücre toleransının sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir
- Uzun ömürlü hafıza benzeri NK hücreleri gelişimi ile ilişkilendirilmiştir.
- Dokuya yerleşik NK (TrNK) hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır.

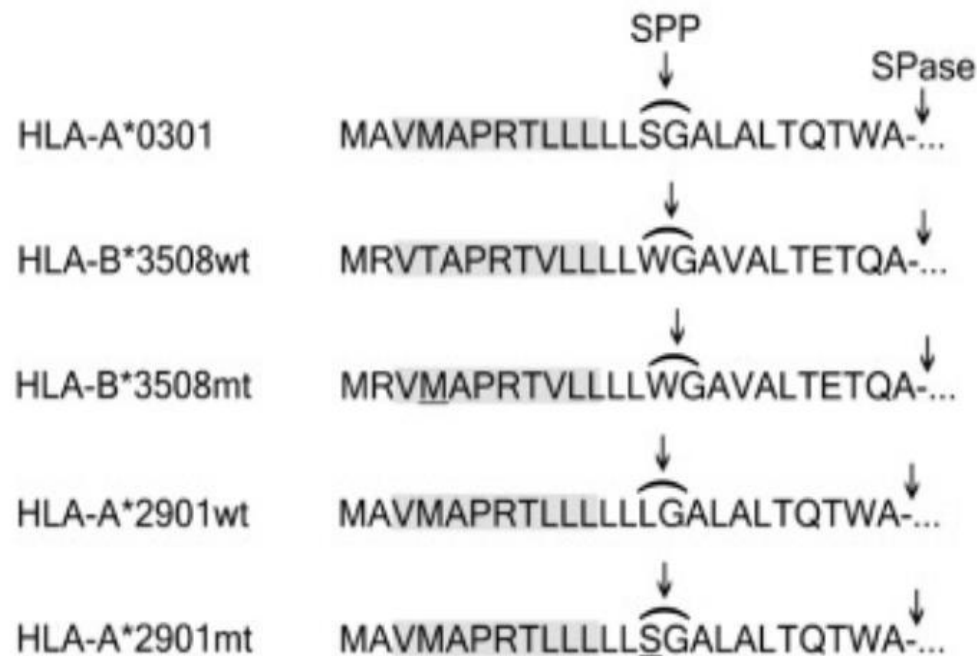
HLA-E Alelleri



- 271 farklı HLA-E aleli ve 110 farklı HLA-E protein molekülü tanınmış olsa da, E*01:01 ve E*01:03 popülasyonun >%99'unu oluşturur.
- HLA-E*01:01 R
- HLA-E*01:03 G

- Bu aleller arasında peptit bağlanma oluğu açısından yapısal bir farklılık olmamasına rağmen, HLA-E*01:03'ün peptitlere afinitesi daha yüksektir.

- HLA-E'ye bağlanan sinyal peptit (SP) korunmuş bir yapıya sahip nonamerdir.
- Peptit 1. pozisyonda valin, 9. pozisyonda lösin (VL9) taşır.
- HLA-E'nin ekspresyonu HLA sınıf I SP polimorfizminden etkilenir çünkü sadece bazı HLA allotipleri HLA-E yüklemesi için uygun peptidler üretebilir.



HLA-E aracılı regülasyonda HLA-A ve HLA-C lokusları baskındır.



Extended Data Fig. 1 | HLA class I SP frequencies in human populations. Allelic frequencies of SP variants were determined based on *HLA class I* allele frequencies obtained from www.allelefrequencies.net for four USA NMDP

populations, including African ($n = 28,557$), European ($n = 1,242,890$), Chinese ($n = 99,672$), and Southeast Asian ($n = 27,978$). SP sequences and corresponding *HLA class I* alleles are shown in Table 1.

- HLA sınıf I SP içindeki polimorfizmler HLA-E fonksiyonlarını aşağıdaki mekanizmalara bağlı olarak etkileyebilmektedir:
 - HLA-E-VL9 kompleksinin oluşması (işlevsel / işlevsel olmayan SP'ler)
 - HLA-E'nin hücre yüzeyindeki ekspresyon düzeyi
 - Peptit nedeniyle HLA-E - CD94/NKG2 arasındaki afinite değişikliği

HLA-E/Peptit – Ligand Etkileşimi

- Moleküler yapının ayrıntılı analizi, bağlanma oluğunun peptit seçiciliğini ortaya koymuştur.

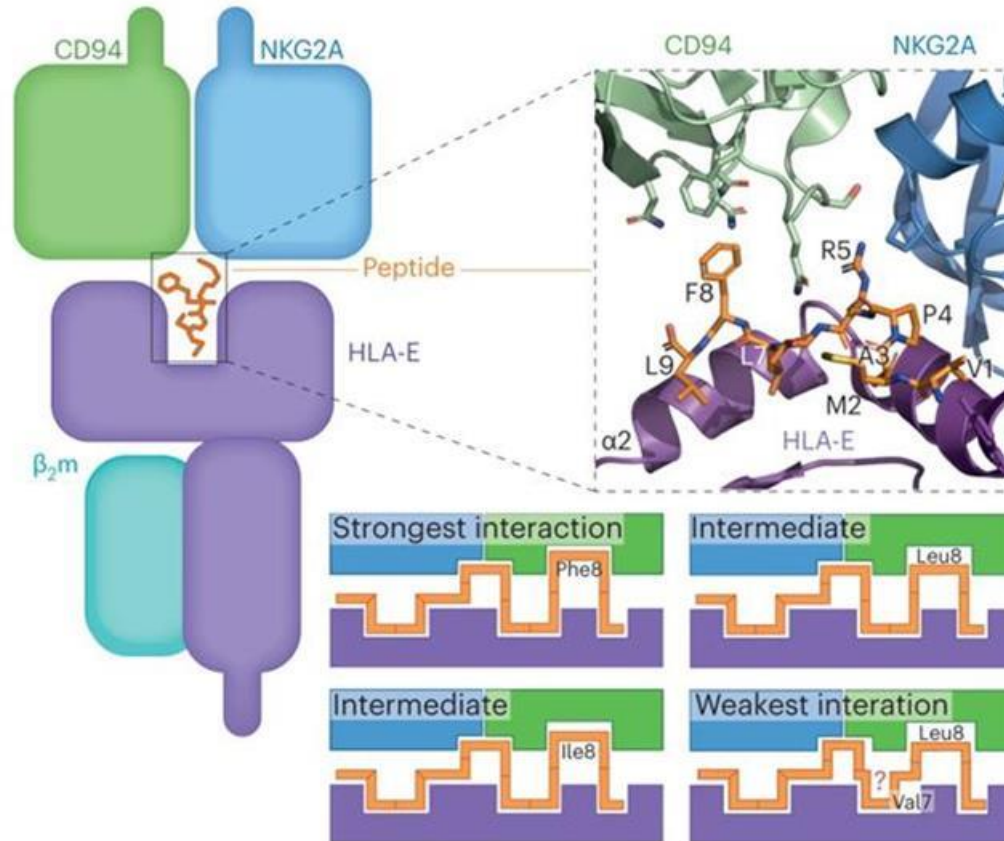


Table 1 | HLA class I signal peptide polymorphism

SP	Sequence ^a	HLA alleles ^b
SP-1A	MAVMAPR <u>TL</u> LLLLSGALALTQTWA	A*01:01, A*03:01, A*03:02, A*11:01, A*30:01, A*30:02, A*36:01
SP-2A	-----V-----	A*02:01, A*02:02, A*02:03, A*02:05, A*02:06, A*02:11, A*23:01, A*24:02, A*24:07, A*25:01, A*26:01, A*34:02, A*66:01, A*68:01, A*68:02
SP-3A	-----L-----	A*29:01, A*29:02, A*31:01, A*32:01, A*33:01, A*33:03
SP-4A	-----L-----R-	A*74:01
SP-5A	---P-----	A*80:01

- SP farklılıklarına bağlı değişkenliklerin CD94/NKG2-HLA-E etkileşimi açısından hastalık direnci veya duyarlılığındaki etkisinin belirlenmesi gereklidir.

SP-1B	-R-T-----W-V--E--	B*13:01, B*13:02, B*18:01, B*27:04, B*27:05, B*37:01, B*40:02, B*40:06, B*44:02, B*44:03
SP-2B	-R-T---V-----E--	B*15:01, B*15:02, B*15:03, B*15:10, B*15:11, B*15:16, B*15:17, B*15:18, B*15:25, B*46:01
SP-3B	-R-T---V---A-----E--	B*40:01, B*41:01, B*45:01, B*49:01, B*50:01
SP-4B	-R-T-----W-----E--	B*55:01, B*55:02
SP-5B	-R-T---V---W-V--E--	B*35:01, B*35:02, B*35:03, B*51:01, B*51:02, B*52:01, B*53:01, B*57:01, B*57:03, B*58:01, B*58:02, B*78:01
SP-6B	-L-----V---A-----E--	B*07:02, B*07:05, B*08:01, B*14:01, B*14:02, B*38:01, B*38:02, B*39:01, B*39:10, B*42:01, B*42:02, B*48:01
SP-7B	-L-----V---W-V--E--	B*81:01
SP-1C	-R-----I-----E--	C*01:02, C*03:02, C*03:03, C*03:04, C*04:01, C*04:03, C*05:01, C*06:02, C*08:01, C*08:02, C*12:02, C*12:03, C*14:02, C*16:01, C*16:02
SP-2C	-R-----E--	C*02:02, C*15:02, C*15:05
SP-3C	-R---A-----G-----E--	C*07:01, C*07:02, C*07:04, C*18:01
SP-4C	-R---QA-----IE--	C*17:01
SP-E	-***DG-----E-----	E*01:01, E*01:03
SP-F	-***-S-----D--	F*01:01
SP-G	-V-----F-----T-E--	G*01:01

^aDashes indicate identity with the top sequence. VL9 sequence is shown in underlining.

^bHLA class I alleles present at frequencies ≥ 0.6% in one or more of the US NMDP populations including African, European, Chinese and southeast Asian populations.

HLA-E ile Sunulan Diğer Peptit Türevleri

- Sinyal peptitlerinin yanı sıra stres proteinlerinden ve böbrek nakli ortamında komplikasyonlara yol açtığı bilinen çeşitli virüslerden türetilen peptitleri de bağlayabilmektedir.

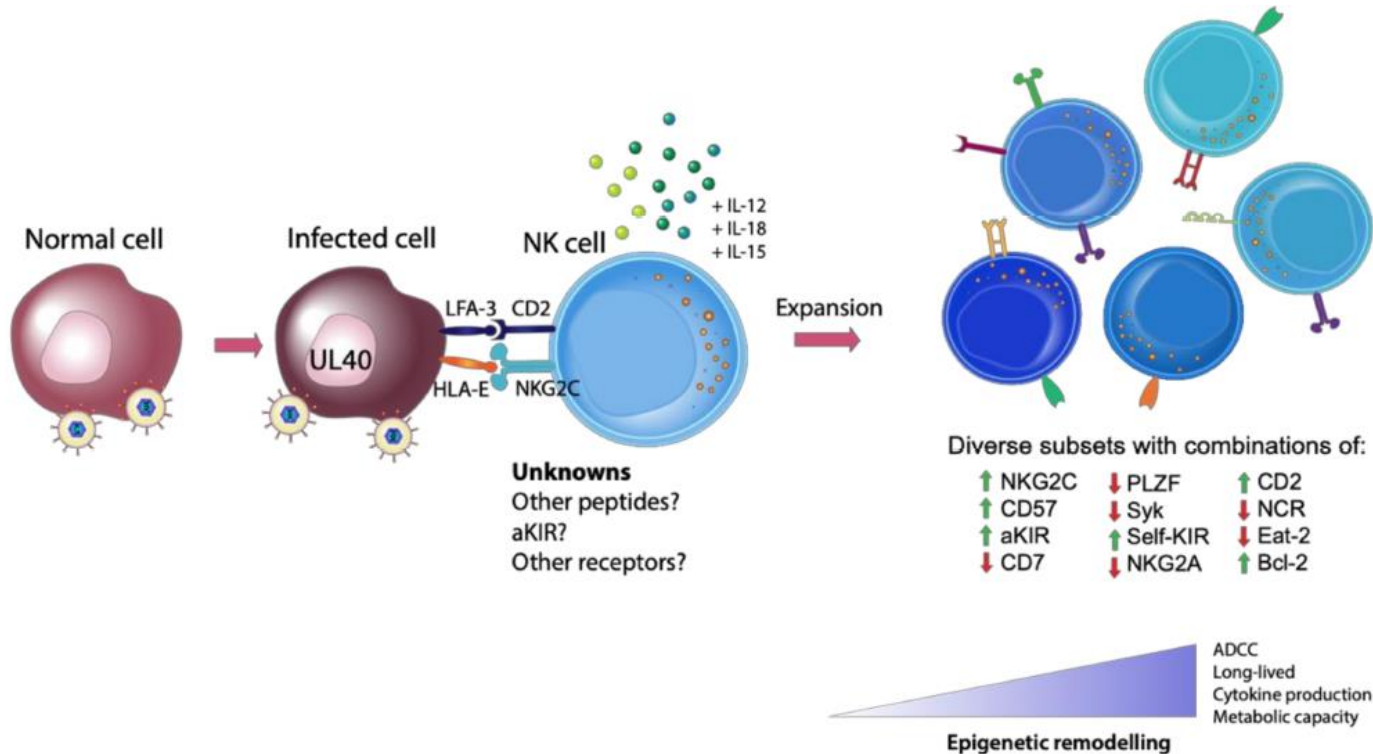
Table 2. Reported HLA-E peptides found in pathogens and self-peptides [18,36,61,74,100,101]

Pathogen	Gene product	HLA-E leader peptide
HCMV	UL40	VMAPRTL(I/V/L)L
Hepatitis C virus	Core	YLLPRRGPR
Epstein-Barr virus	BZLF1	SQAPLPCVL
HIV	P24	AISPRTLNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mtb14, P49,	RMAATAQVL, RMPPLGHEL,
<i>Salmonella typhimurium</i> serovar Typhi	Mtb44 GroEL	RLPAKAPLL GMQFDRGYL
Self-peptides		
n.a.	HSP60	QMRPVSRL
n.a.	ATP-binding cassette protein MRP7	ALALVRMLI

HLA = human leucocyte antigen; HCMV = human cytomegalovirus; HSP = heat shock protein; ATP = adenosine triphosphate; MRP = multi-drug-resistance protein; n.a. = not available.

HLA-E ve CMV

- CMV tarafından üretilen UL40, HLA-E'ye bağlanarak CD94/NKG2A aracılı fonksiyonları inhibe eder.
- Enfekte hücrelerin NK hücre lizisinden kaçmasını sağlar.
- CMV enfeksiyonu bağlamında adaptif NK hücreleri tanımlanmıştır.



HLA-E Alelleri – Tx İlişkisi

> Cells. 2019 Aug 7;8(8):847. doi: 10.3390/cells8080847.

- **HLA-E Polymorphism Determines Susceptibility to BK Virus Nephropathy after Living-Donor Kidney Transplant**
Hana Rohn¹, Rafael Tomoya Michita^{2 3}, Sabine Schramm², Sebastian Dolff⁴, Anja Gäckler⁵,
nde edde karşı

Her iki çalışmada da NK hücre reaktivitesi üzerindeki etkiler ele alınmamıştır

- **HLA-E genotyping and its relevance in kidney transplantation outcome**
Bruna L M de Miranda¹, Geórgia F Gelmini¹, Matilde Risti¹, Vanessa Hauer¹,
José Samuel da Silva¹, Valéria M M S Roxo¹, Maria da Graça Bicalho¹, Danielle Malheiros²
nu kaynaklı

HLA-E ve Tx için bazı sorular ...?

- HLA-E ekspresyon düzeylerinin greft mikro çevresinden etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir.
- Graft ve alıcı HLA SP polimorfizmlerinin ekspresyonlara etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir.
- Graftteki NK reseptör repertuarlarının daha derinlemesine analizi ortaya konmamıştır.
- CMV infeksiyonu veya reaktivasyonunda HLA-E ilişkili adaptif NK fonksiyonları aydınlatılmalıdır.

Özetle...

HLA-E ile sunulan peptit NK ve hedef hücre fonksiyonlarını belirler.

HLA sinyal peptit polimorfizmleri HLA-E ile bağlanma özellikleri üzerinden NK fonksiyonlarında etkilidir.

HLA-F

HLA-F hücre yüzeyinde iki farklı formda bulunur.

HLA-F'nin bu farklı formları, NK hücre reseptörü bağlanma tipinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar.

HLA-F	Receptor	Function	Cell types
Open Conformer	KIR3DS1 KIR3DL1 KIR3DL2	Activating Inhibitory Inhibitory	NK
Complex with β_2 M & peptide	LIR1	Inhibitory	NK, monocyte, T, B
	KIR?	Inhibitory Activating	NK
	TCR?	Activating	T

Açık konformasyon
KIR

Heterodimer
LILR

HLA-F

- İnsanlarda çok düşük düzeyde polimorfizme sahiptir.
- Primatlar arasında yüksek düzeyde korunmuştur.
- Bu özellik bağışıklık tepkisinde korunmuş önemli bir işlevinin olduğuna işaret olarak kabul edilmektedir.
- Dinlenme halindeki hücrelerde hücre içindedir.
- Aktive lenfositler ve virüsle enfekte olmuş hücreler dahil olmak üzere bazı hücrelerin hücre yüzeyinde ifade edildiği gösterilmiştir.

Bulgular NK reseptörleriyle etkileşimde açık konformer formlarının fonksiyonel olabildiğini göstermektedir.

➤ [J Immunol.](#) 2013 Oct 1;191(7):3553-62. doi: 10.4049/jimmunol.1300081. Epub 2013 Sep 9.

HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors

Jodie P Goodridge¹, Aura Burian, Ni Lee, Daniel E Geraghty

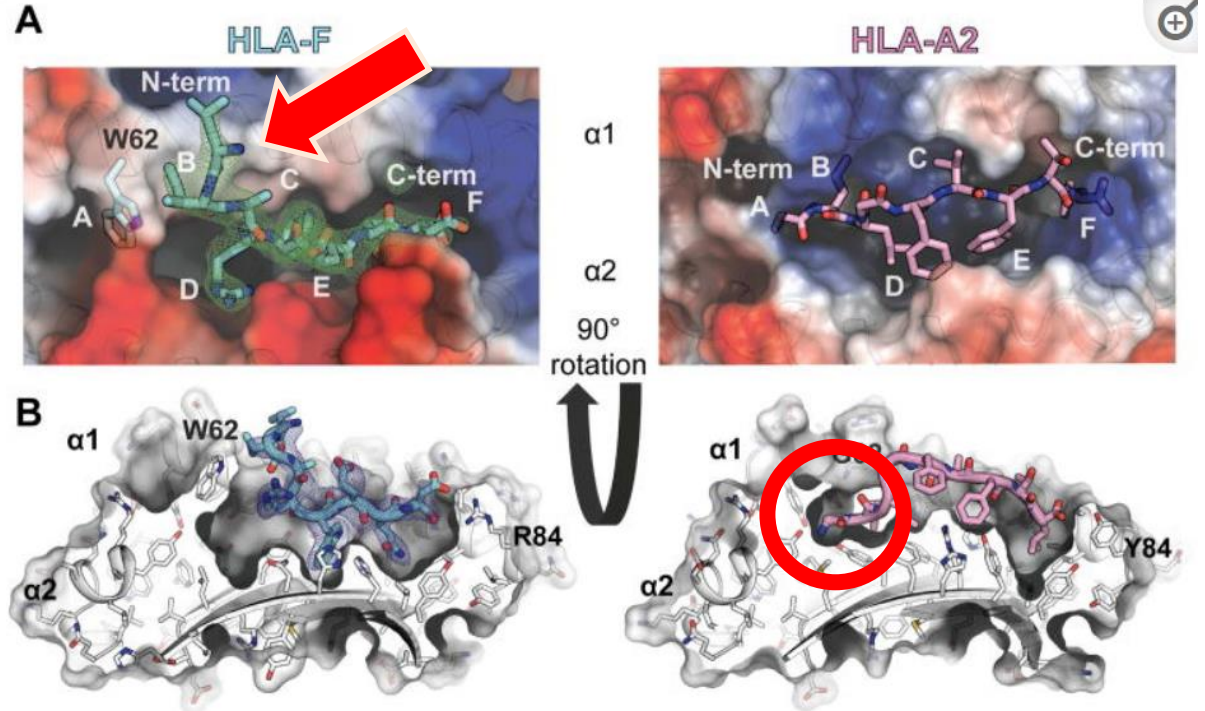
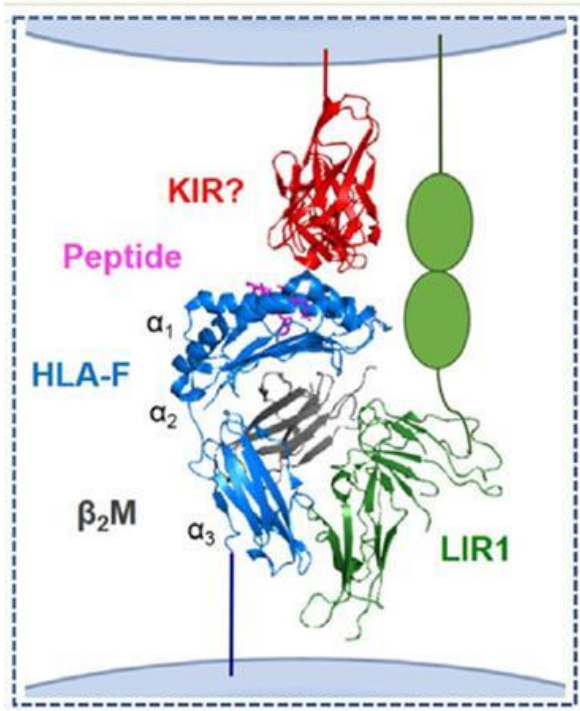
➤ [Nat Immunol.](#) 2016 Sep;17(9):1067-74. doi: 10.1038/ni.3513. Epub 2016 Jul 25.

Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1

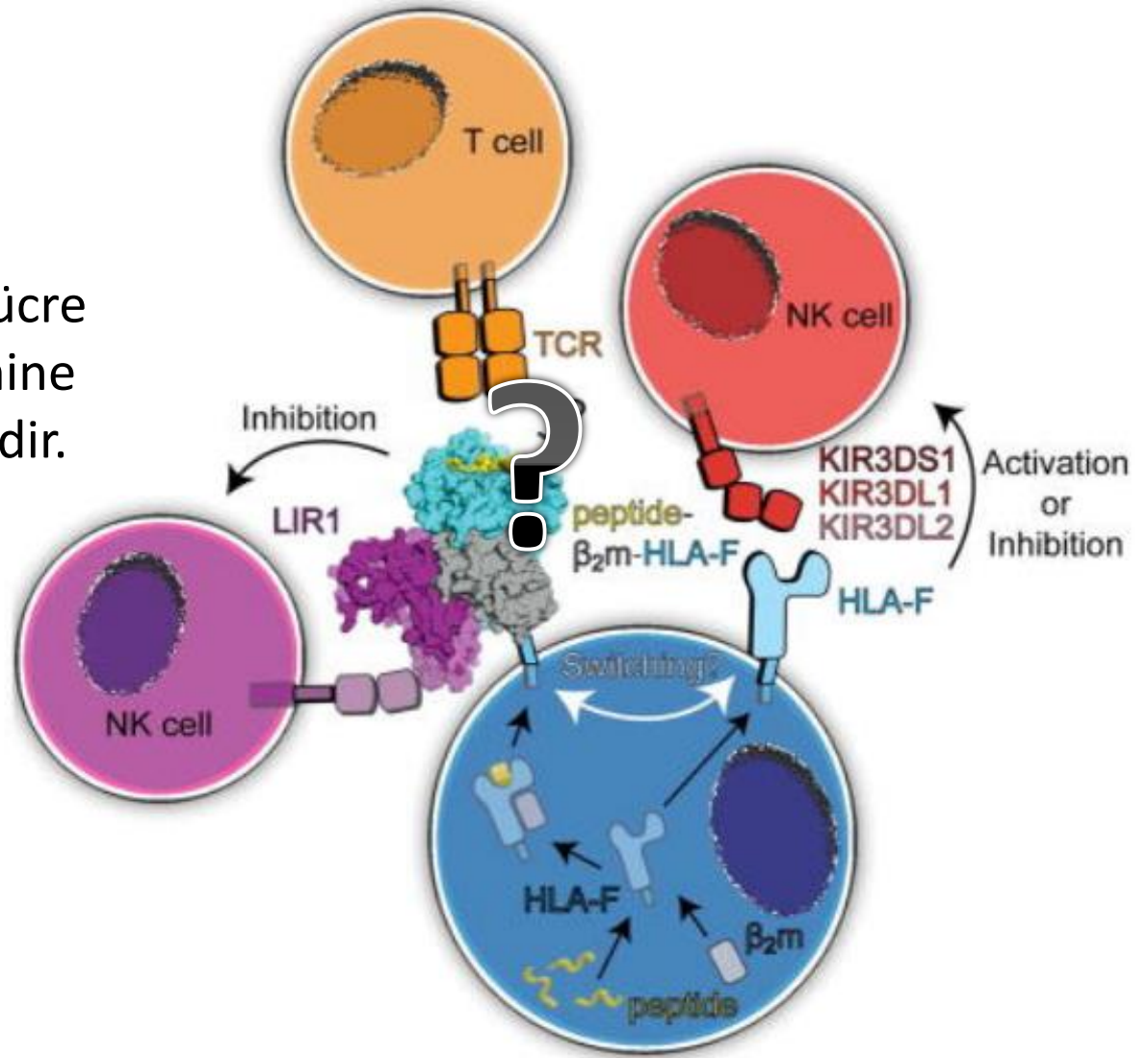
Wilfredo F Garcia-Beltran¹, Angelique Hölzemer^{1 2 3}, Gloria Martus², Amy W Chung¹, Yovana Pacheco^{1 4}, Camille R Simoneau¹, Marijana Rucevic¹, Pedro A Lamothe-Molina¹, Thomas Pertel⁵, Tae-Eun Kim¹, Haley Dugan¹, Galit Alter¹, Julie Dechanet-Merville⁶, Stephanie Jost¹, Mary Carrington^{1 7}, Marcus Altfeld^{1 2}

HLA-F, açık uçlu ag-bağlama oluğuna sahiptir.

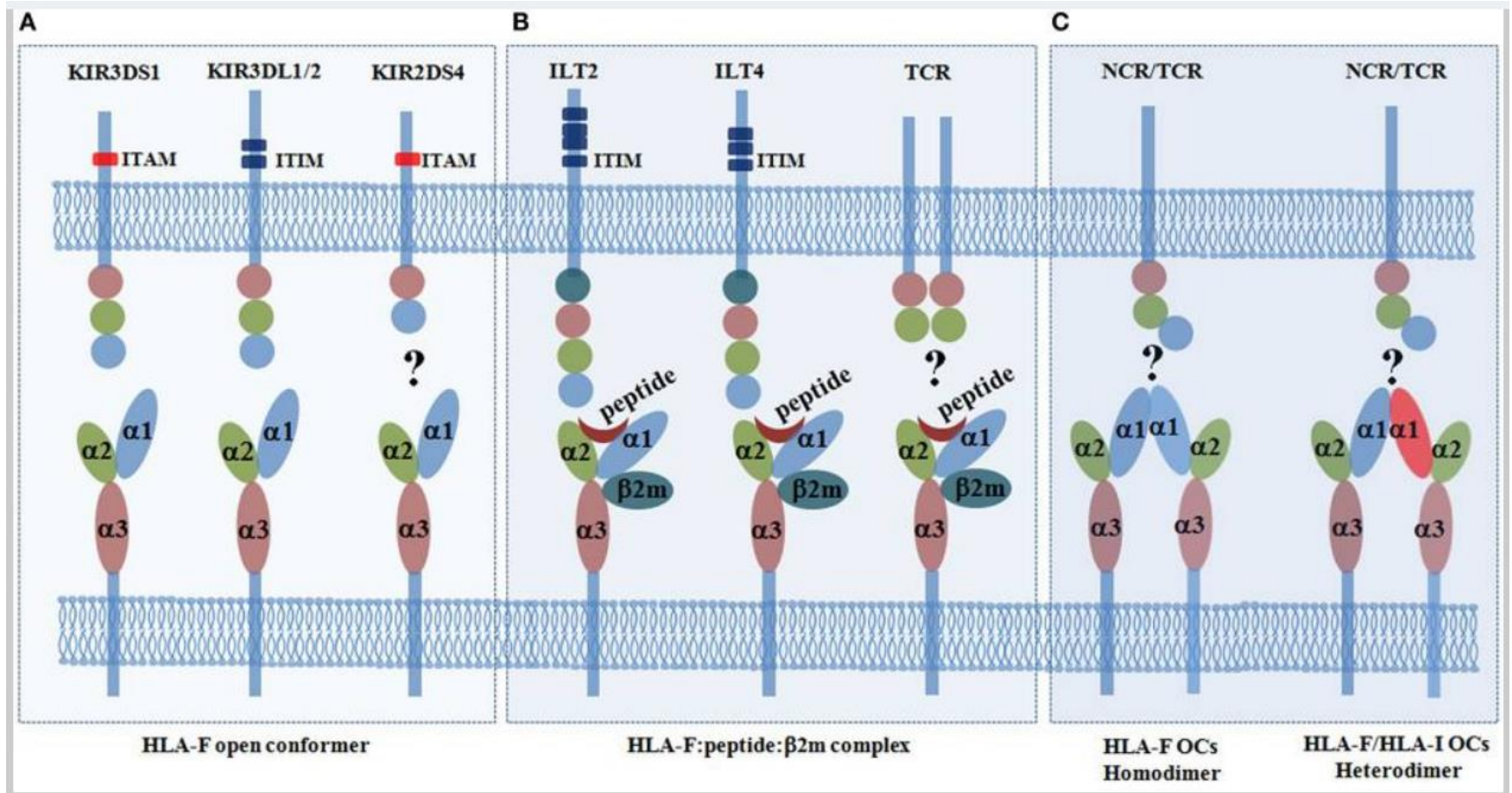
Sınıf I için karakteristik olmayan uzun peptitlerin sunumu yapabilir.



- Peptit sunumu yaptığı gösterilmiş olmasına rağmen HLA-F'nin T hücre reseptörü ile etkileşimine dair bulgular net değildir.

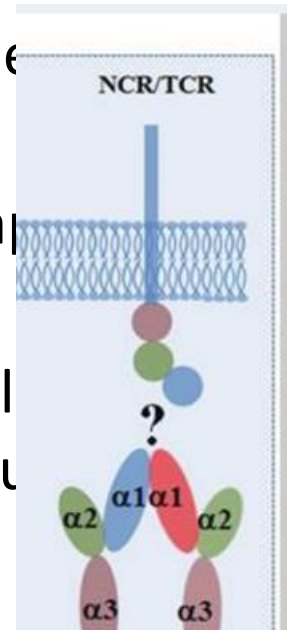


HLA-F Ligandları



HLA-F Açık Konformer Heterodimerleri

- HLA-F, peptitsiz açık konformerler halinde MHC-I proteinleriyle heterodimer olarak
- Ancak $\beta 2m$ 'ne bağlı ve peptit sunumu yapan komplekslerle birleşmez.
- Bu heterodimerlerin hücre dışından agalmanın çapraz sunumda rolü olduğuna dair bulgular ortaya konmuştur.



> J Immunol. 2013 Aug 15;191(4):1567-77. doi: 10.4049/jimmunol.1300080. Epub 2013 Jul 12.

HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in a MHC-I antigen cross-presentation pathway

Jodie P Goodridge ¹, Ni Lee, Aura Burian, Chul-Woo Pyo, Scott S Tykodi, Edus H Warren, Cassian Yee, Stanley R Riddell, Daniel E Geraghty

HLA-F'nin Tx için önemi olabilir mi?

- Heterodimer formlarının olası oluşumunun araştırılmasına ve transplantasyondaki rolünün aydınlatılmasına acil ihtiyaç vardır.
- Bu formlar organ nakli veya allograft toleransı ve reddi dahil olmak üzere çeşitli hastalık durumlarında önemli fonksiyonel ve immünolojik etkilere sahip olabilir.

PRA?
RED?
DSA?
TOLERANS?

Özetle...

HLA-F, polimorfizmi ve hücresel ifadesi en düşük HLA'dır.

Peptit ve β 2m içermeyen açık konformer formları NK reseptörleri ile bağlanmaktadır.

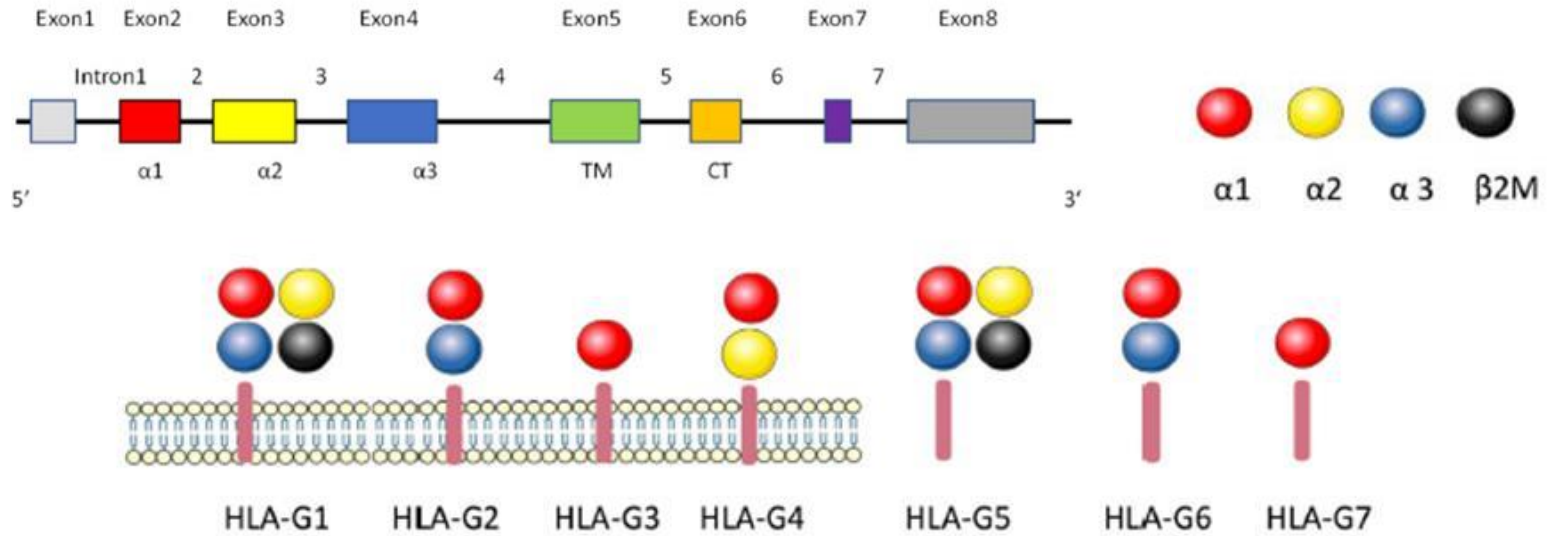
Normalden uzun peptitleri sunabilen bu evrimsel korunmuş proteinlerin önemi tam olarak bilinmemektedir.

HLA-G

HLA-G

- Non-klasik HLA ailesinin en polimorfik temsilcidir, 58 farklı alel ile 17 farklı protein kodlanır.
- HLA-G*01:01 dünya çapında en yaygın varyanttır; Avrupa'da bunu HLA-G*01:04 ve HLA-G*01:03 takip etmektedir.
- Alternatif birleştirmenin aracılık ettiği mekanizmalarla yedi farklı izoformu bulunur.
 - HLA-G1-G4 membrana bağlı izoformlar
 - HLA-G5-G7 çözünür izoformlar
- Ağırlıklı olarak plasenta ve akciğerde eksprese edilen matriks metalloproteinaz-2 (MMP2) aracılığı ile membrana bağlı HLA-G1 hücre yüzeyinden kesilerek çözünür formda da salınmaktadır.

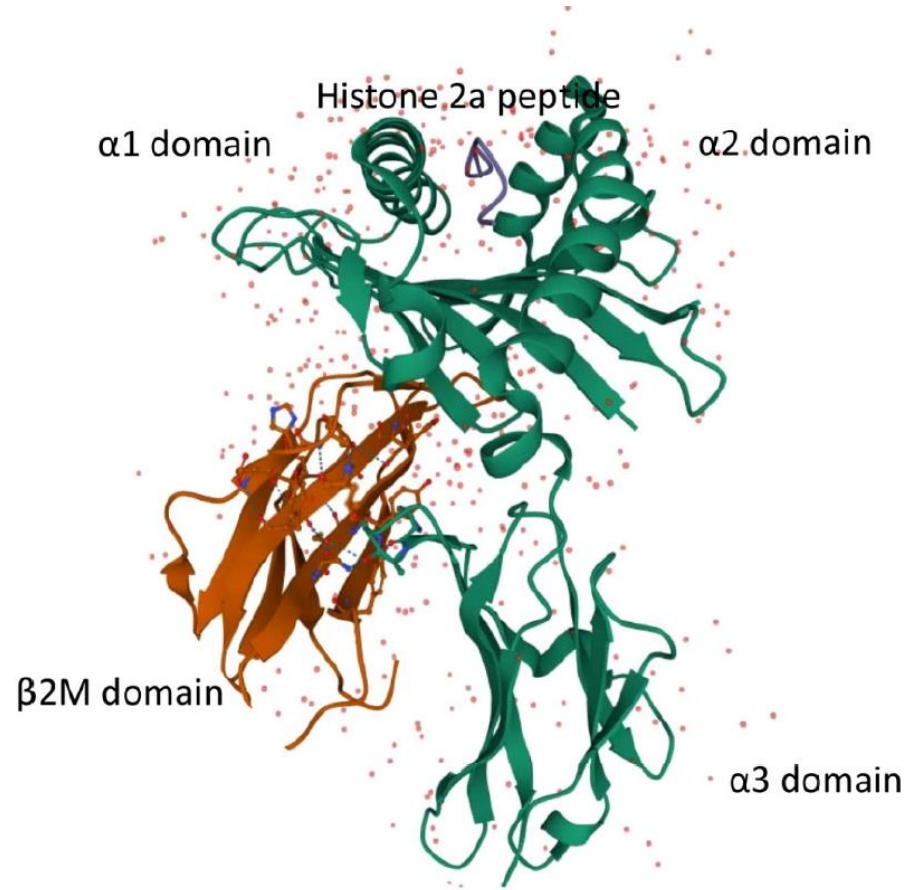
HLA-G



- HLA-G3 dışındaki tüm membran HLA-G izoformları homodimerler oluşturabilir.
- Dimerizasyon HLA-G ile reseptörleri arasındaki etkileşimi de etkiler.
- Çözünür HLA-G izoformları ağırlıklı olarak monomeriktir.

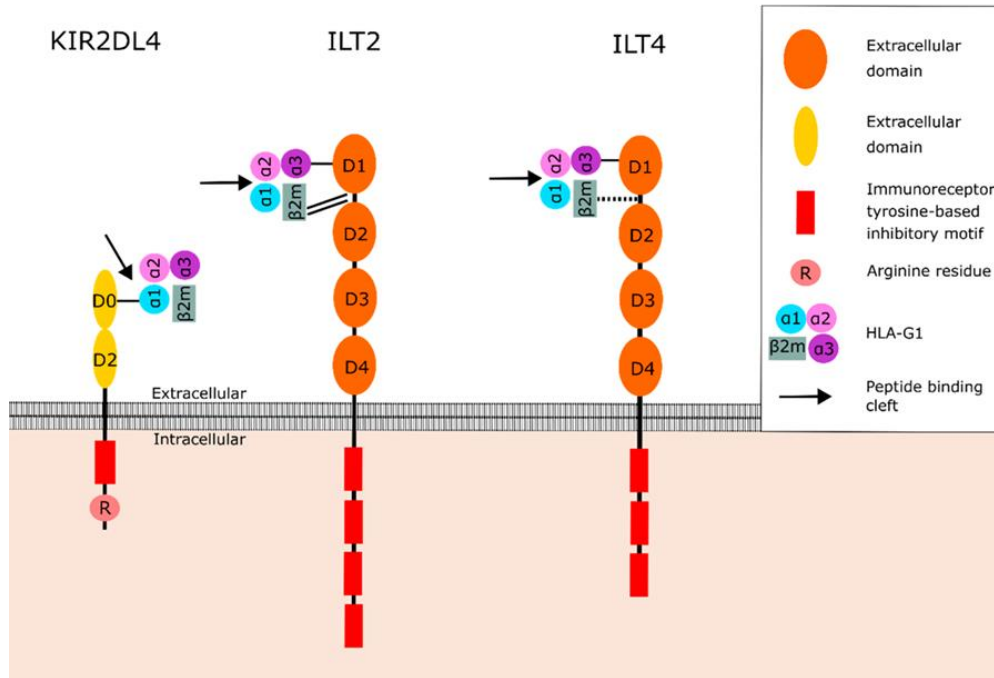
HLA-G Peptit Sunumu

- Sınırlı bir peptit repertuarı vardır. Ancak HLA-E'ye kıyasla daha çeşitlidir.
- Hücre yüzeyine taşınması ancak yüksek afiniteli peptidlerin bağlanmasıyla sağlanır.
- Ancak ligandlarıyla arasındaki etkileşim, sunulan peptitten etkilenmez.
- Peptit sunumu molekülün hücre yüzeyindeki stabilizasyonunu uzatır.



HLA-G Ligandları

- NK hücrelerinde KIR2DL4, ILT2 ve ILT4, T hücrelerinde ILT2, makrofajlarda ILT4 ve dendritik hücrelerde ILT4/CD160 gibi reseptörlere bağlanır.
- HLA-G ile etkileşim, genellikle etkileşime giren immün efektör hücrelerin inhibisyonuna yol açar.



HLA-G Ligandı KIR2DL4 diğer KIR ailesinin diğer üyelerinden farklıdır.

NK fonksiyonlarını farklı koşullar altında hem aktive hem de inhibe edebilir.
KIR ailesinin HLA-G bağlayan tek üyesidir.

HLA-G ve NK Fonksiyonları

- HLA-G ekspresyonu, periferik kanda ve NK hücre hatlarında NK hücre sitotoksitesine karşı hedef hücreleri korumaktadır.
- ILT2 aracılı bağlanmanın NK sitotoksitesini ve IFN- γ üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir.
- Çözünür HLA-G formları sitokin ve kemokin salgılanmasını modüle edebilmektedir. CCL2, CCL8 ve CXCL2-CXCL3 salgılanmasını arttırmaktadır.

Çeşitli virüsler enfekte ettikleri hücrelerde HLA-G ifadesini arttırarak immün kaçış sağlamaktadır.

Table 1

HLA-E and HLA-G expression modifications during viral infections and their effect on immune system.

Virus	Expression	Effects	References
HCV	HLA-E up-regulation HLA-G up-regulation	Decreased cytotoxicity of effector cells	22, 23 27, 32, 33, 34, 35
HIV	HLA-E/HIV-1 peptide	NK cell activation – viral spreading NK cell inhibition	26 36, 37
CMV	HLA-G up-regulation HLA-E up-regulation HLA-G up-regulation	Inhibitory signal	24 29, 30, 31
HPV	HLA-E up-regulation HLA-G up-regulation	NK inhibition Immune escape	25 38
HBV	HLA-G up-regulation	Immune escape	32, 33
HHV-6	HLA-G up-regulation	Immune escape	41
HSV-1	HLA-G up-regulation	Immune escape	42
SARS-CoV-2	HLA-E up-regulation HLA-G: Early phase Replication phase Remission phase	NK cell inhibition Hyper-inflammation MMPs activation Immune response control	50, 51, 54, 55 60, 61 61, 63 60

Özetle...

HLA-G, non-klasik HLA ailesinin en polimorfik temsilcidir. Membrana bağlı ve çözünür formları vardır.

Yüksek afiniteli peptidleri bağlar. Ama ligandlarıyla etkileşimi sunulan peptitten etkilenmez.

KIR2DL4 bağlayan tek moleküldür.
NK dahil bağlandığı hücreler üzerinde daha çok inhibitör etkiler göstermektedir.

PSEUDOGENLER

Pseudogenler önemli olabilir mi?

- HLA Sınıf I bölgesinde çok sayıda pseudogen belirlenmiştir.

[illegible]

HLA-H

- Veri bankasında tanımlanmış 72 aleli bulunmaktadır.
- Ekzom verilerinde yapılan analizler *H*02:07* ve *H*02:14* alellerinin membrana bağlı tam bir HLA proteinini kodlamaya aday olduğunu göstermiştir.
- Bu sonuçların işlevsel anlamının hem fizyolojik hem de patolojik bağlamlarda araştırılması gerekmektedir.



Molecular Immunology
Volume 112, August 2019, Pages 40-50



*HLA**Ab* worldwide genetic diversity: New
HLA-H alleles and haplotype structure
description

[Julien Paganini](#)^a, [Laurent Abi-Rached](#)^{b c}, [Philippe Gouret](#)^a, [Pierre Pontarotti](#)^{a b c},
[Jacques Chiaroni](#)^{d e}, [Julie Di Cristofaro](#)^{d e}  

HLA-H

- Bir başka çalışma HLA-H'nin, bir transmembran molekülü olarak ve/veya HLA-E'yi hücre yüzeyine mobilize ederek sinyal peptidi aracılığıyla dolaylı olarak etki gösterebileceği bildirilmiştir.
- Aynı çalışma HLA-H sinyal peptidi inkübasyonunun, T-lenfositlerin, monositlerin, B-lenfositlerin ve primer epitel hücrelerinin hücre yüzeyindeki HLA-E moleküllerini harekete geçirdiğini göstermiştir.
- Bu sonuçlar HLA-H'nin işlevsel olabileceğine dair ele alınması gereken birçok biyolojik sorunu gündeme getirmektedir.

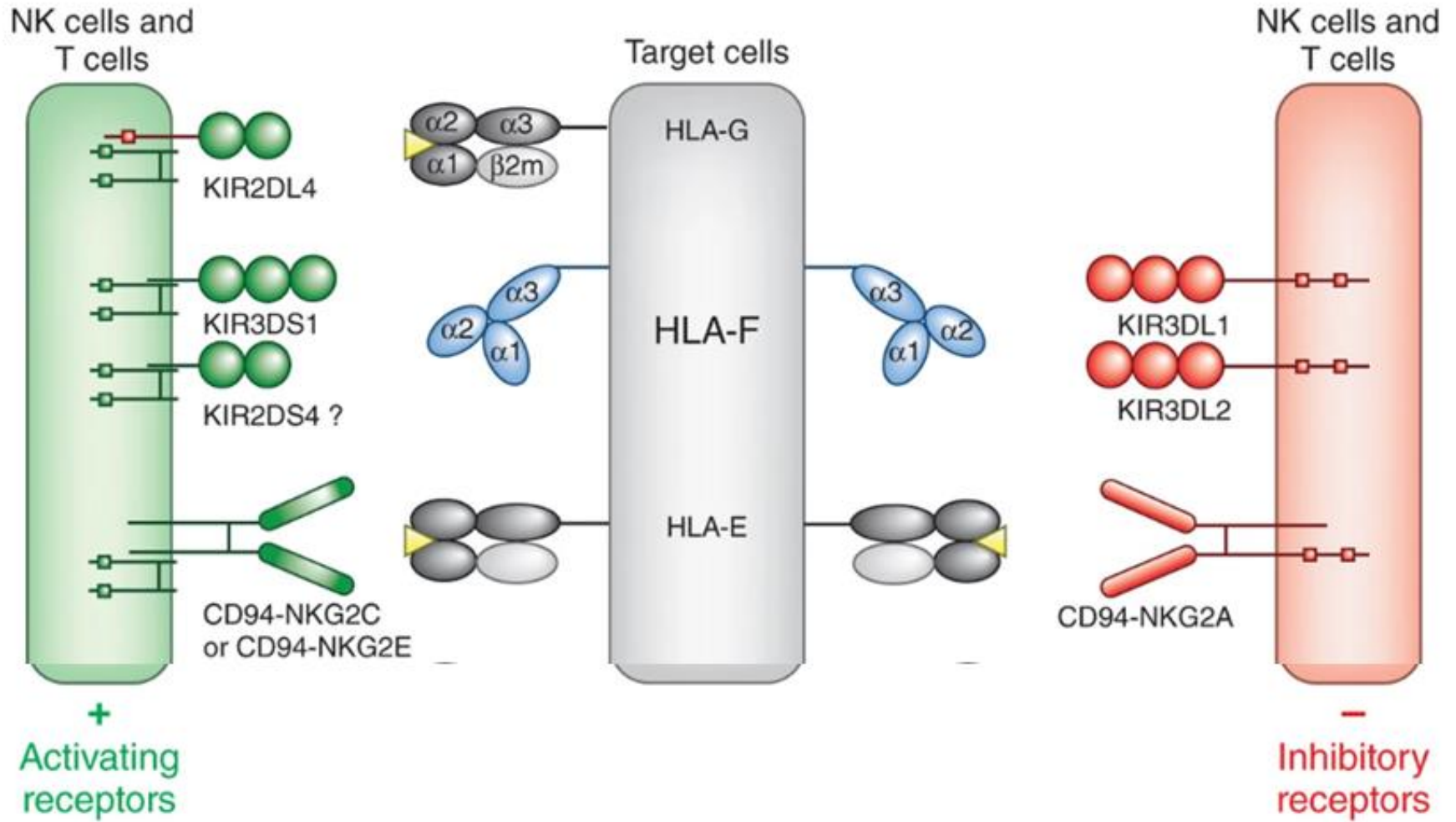
HLA-J

- Gen spesifik TaqMan bazlı Primer/Prob setleriyle analiz edilen taze dondurulmuş meme kanseri numunelerinde HLA-J ekspresyonu gösterilmiş ve tedavi sonrasında HLA-J mRNA seviyelerinin sıklıkla arttığı bildirilmiştir.

HLA-H, HLA-J ve diğer pseudogenlerin transplantasyon ile ilgili biyolojik süreçlerde önemli olup olmadığı bilinmemektedir.

SONUÇ

- Non-klasik HLA az polimorfik olması ve hücresel düzeylerinin düşük olması nedeniyle transplantasyon süreçleri açısından önemsenmemiş bir grup moleküldür.
- Ancak NK hücreleri başta olmak üzere immün yanıtlar üzerindeki düzenleyici potansiyelleri daha dikkatli incelenmelidir.
- NK hücre alt popülasyonlarının immünoterapötik potansiyeli, toleransın uyarıldığı veya korunduğu ortamlar için daha fazla araştırılmalıdır.



DİKKATİNİZ VE DİNLEDİĞİNİZ TEŞEKKÜR EDERİM...