

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

TIM-3 POLİMORFİZMLERİNİN ASTIM HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ

Nilüfer ÇİÇEK EKİNCİ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

This document was created by Print2PDF

<http://www.software602.com>

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

TIM-3 POLİMORFİZMLERİNİN ASTIM HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ

Nilüfer ÇİÇEK EKİNCİ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Olcay YEĞİN

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005.02.0122.002).

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2007

This document was created by Print2PDF

<http://www.software602.com>

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
27/04/2007

Tez danışmanı :Prof. Dr. Olcay YEĞİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :Prof. Dr. Burhan SAVAŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :Doç. Dr. Ayşen UĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye :Yrd. Doç. Dr. Nuray ERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yakın bir zamanda, Th1 hücre yüzeyinde TIM gen ailesine ait olan Tim-3 adında yeni bir reseptör tanımlanmış ve bu molekülün etkisinin Th1 yönetimli immün yanıtlar üzerine olduğu bildirilmiştir. Bu reseptörün, T lenfositlerde eksprese edilen Galectin-9 adlı ligandı ile etkileşimi sonucunda efektör Th1 hücrelerinin eliminasyonuna neden olduğu ve fonksiyonunun bozulması halinde Th1/Th2 yanıtı dengesinin etkilenebileceği gösterilmiştir. Nitekim, bazı toplumlarda TIM-3 geninin değişik polimorfizmlerinin, astım ve allerjik rinit insidansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Türk toplumunda henüz bu konuya yönelik yapılmış bir çalışma olmaması nedeniyle, TIM-3 geninin ifadesine etkili olabileceği muhtemel olan promotör bölgesindeki -574 T>G ve 3. exondaki +4259 G>T polimorfizmlerinin Türk toplumundaki dağılımını ortaya koymayı ve bu polimorfizimlerin astım hastalığının oluşumu ile bir ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla, 76 hasta ve 91 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundaki kişilerin periferik kanından izole edilen genomik DNA dan ARMS-PCR yöntemi kullanılarak genotiplendirme yapılmıştır. TIM-3 geni -574 T>G polimorfizimi için GG, GT ve TT genotip frekansları kontrol grubunda sırasıyla 0.81, 0.17 ve 0.01; hasta grubunda ise 0.75, 0.22 ve 0.03 (p=0,34; Odds oranı=1,43) olarak saptanırken, +4259 G>T polimorfizimi için TT, GT ve GG genotip frekansları kontrol grubunda sırasıyla 0.79, 0.21 ve 0.0; hasta grubunda ise 0.89, 0.11 ve 0.0 (p=0,13; Odds oranı=0,540) olarak bulunmuştur. Her iki polimorfizmde de genotip ve allel frekansları açısından astım ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Türk toplumunda ilk kez yapılmış olan bu çalışmada her ne kadar incelediğimiz polimorfizmler ve astım hastalığı arasında bir ilişki saptanamamışsa da, Türk toplumunun TIM-3 geni -574 T>G polimorfizimi dağılımı açısından Kore toplumu ile benzerlik gösterdiği ancak, +4259 G>T polimorfizmi dağılımının Çin ve Kore toplumundan farklı olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Astım, Tim-3, Tim-3 4259 G>T, Tim-3 -574 T>G, ARMS-PCR

ABSTRACT

Recently, a new receptor named Tim-3 has been identified on Th1 cells. TIM-3 is a member of TIM gene family and affects immune response mediated by Th1. The ligand for Tim-3, galectin -9, is expressed on T cells and interaction of Tim-3 with its ligand causes apoptosis in the Th1 cells. It has been shown that dysregulation of Tim-3 functions affects balance of Th1/Th2 immune responses. To support this view, correlations have been found between atopic diseases and polymorphisms of TIM-3 gene in various populations.

In this study, we aimed to investigate whether any correlation exists between the occurrence of asthma and two of the TIM-3 gene polymorphisms, namely -574 T > G and +4259 G>T, in the Turkish population. For this purpose, we have isolated genomic DNA from peripheral blood of 76 asthmatic patients and 91 healthy individuals, and analysed for the presence of the above-mentioned polymorphisms using ARMS-PCR technique.

For the -574 T > G polymorphism, we found that GG, GT and TT frequencies were 0.81, 0.17 and 0.01 in the control group and 0.75, 0.22 and 0.03 in the patient group, respectively ($p=0.34$, Odds ratio = 1,43). Whereas, for the +4259 G>T polymorphism, the genotype frequencies for TT, GT and GG were 0.79, 0.21, 0.0 for control group and 0.89, 0.11, 0.0 for the test group, respectively ($p=0,13$, Odds ratio = 0,540). We failed to detect a statistically significant difference with respect to the genotype frequencies of the patients and controls.

Although, there was not a correlation between the presence of any of these polymorphisms and the occurrence of asthma, we have found that the genotype distribution of the Turkish population for the -574 T>G polymorphism exhibited a similar pattern to that of seen in Korean population. However, the distribution of the other polymorphism was found to be different from either Chinese or Korean populations.

Key words: Asthma, Tim-3, Tim-3 4259 G>T, Tim-3 -574 T>G, ARMS-PCR

TEŞEKKÜR

İmmünoloji Yüksek Lisansı yapmama fırsat tanıyıp hayallerimi gerçekleştiren; öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Prof. Dr. Olcay YEĞİN' e,

Laboratuar çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Uğur YAVUZER ve Phd. Nilüfer GÜLMEN İMİR' e,

Tezimle ilgili her konuda yardımlarını esirgemeyen Doç Dr. Ayşen UĞUZ' a,

Hasta grubunun oluşturulmasındaki desteğinden dolayı Dr. Fatih ÇELMELİ' ye,

Tezimle ilgili olguların saptanması ve kan örneklerinin toplanması sırasındaki samimi çabasından dolayı Dr. Dilara KOCACIK' a,

Tez çalışmalarım süresince manevi destekleriyle yanımda olan aileme ve immünoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Ve hiç yanımdan ayrılmayarak, tezimin yazım aşamasında da desteğini sürekli hissettiren kızım Yeşim EKİNCİ' ye teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	SAYFA
ÖZET	4
ABSTRACT	5
TEŞEKKÜR	6
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	7
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	9
TABLolar DİZİNİ	11
ŞEKİLLER DİZİNİ	12
ÇİZELGELER DİZİNİ	13
GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	14
1.1. Th1/Th2 Farklılaşmasının Mekanizması	14
1.2. Astım Hastalığında Rol Oynayan Hücreler	16
1.2.1. Astımı Tetikleyen Faktörler	17
1.2.2. Astım Hastalığının Genetiği	18
1.3. TIM Gen Ailesinin Tanımlanması	19
1.3.1. TIM-1	19
1.3.2. TIM-4	19
1.3.3. TIM-2	20
1.3.4. TIM-3	20
1.3.4.1. TIM-3'ün Ligandı Galectin-9	20
1.3.4.2. TIM-3 ve Galectin-9 Yolağı	21
1.3.4.3. TIM-3 Genindeki Polimorfizmler	23
OLGULAR VE YÖNTEM	
2.1. Olgular	25
2.2. DNA İzolasyonu	25

2.3.	ARMS-PCR	26
2.3.1.	TIM-3 Geni -574 T>G Polimorfizminin Araştırılması	26
2.3.2.	TIM-3 Geni +4259 G>T Polimorfizminin Araştırılması	27
BULGULAR		
3.1.	-574 T>G TIM-3 Polimorfizminin ARMS-PCR Sonuçları	30
3.2.	+4259 G>T TIM-3 Polimorfizminin ARMS-PCR Sonuçları	30
TARTIŞMA		
34		
SONUÇLAR		
37		
KAYNAKLAR		
38		
ÖZGEÇMİŞ		
44		
EKLER		
45		
Ek.1	Th1 için spesifik yüzey molekülleri (www.bdbiosciences.com/image_library/Th1-Th2_pathway)	
Ek.2	Th2 için spesifik yüzey molekülleri (www.bdbiosciences.com/image_library/Th1-Th2_pathway)	
Ek.3	TIM-3 geni polimorfizm lokalizasyonları (67).	
Ek.4	TIM-3 -574 T>G polimorfizmi için çoğaltılan gen bölgesi (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar)	
Ek.5	TIM-3 +4259 G>T polimorfizmi için çoğaltılan gen bölgesi (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar)	
Ek.6	beta- actin için çoğaltılan gen bölgesi (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar)	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHR	: Airway Hyperreactivity
AP-1	: Activating Protein-1
APC	: Antigen Presenting Cells
ARMS	: Amplification Refractory Mutation Systems
ASPCR	: Allelic Specific Polymerase Chain Reaction
Ca²⁺	: Calcium
CD	: Cluster of Differentiation
CI	: Confidence Interval
Crsp9	: Coregulator of the SP-1 Transcription Factor
CTLA4	: Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4
DC	: Dendritic Cell
EAE	: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ECP	: Eosinophil Cationic Protein
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO	: Eosinophil Peroksidase
Foxp3	: Forkhead Box P3
GITR	: Glucocorticoid- Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Receptor
GM-CSF	: Granulosit Monosit-Cell Stimulating Factor
HAVcr1	: Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1
HBA	: Interval-Specific Conjenic Mouse
HLA	: Human Leukocyte Antigene
H₂SO₂	: Sulphuric Acid
ICAM-I	: Intracellular Adhesion Molecule-1
IFN-γ	: Interferon-Gamma
IgE	: Immunoglobulin E
IL	: Interleukin

Itk	: IL-2 Inducible T Cell Kinase
Kim1	: Kidney Injury Molecule-1
MBP	: Major Basic Protein
MCP	: Monocyte Chemoattractant Protein
MS	: Multiple Sclerosis
NFAT	: Nuclear factor of activated T cells
NO₂	: Nitride
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RA	: Rheumatoid Arthritis
Sema4A	: Semaphorin 4A
SH2	: Src Homology 2
siRNA	: Small Interfering RNA
SO₂	: Sulphur di Oxide
Tapr	: T cell and Airway Phenotype Regulator
TGF-β	: Tumor Growth Factor-Beta
Th	: T Helper
TIM	: T cell Immunoglobulin Mucin
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor-Alpha
VCAM-I	: Vascular Adhesion Molecule-1

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. -574 T>G TIM-3 ARMS-PCR için kullanılan malzemeler.	27
2.2. +4259 G>T TIM-3 ARMS-PCR için kullanılan malzemeler.	28
3.1. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı.	30
3.2. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin birliktelik testleri (%95 CI).	31
3.3. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı.	32
3.4. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin birliktelik testleri (%95 CI).	33
4.1. +4259 G>T polimorfizmindeki genotip dağılımının karşılaştırılması.	35
4.2. -574 T<G polimorfizmindeki genotip dağılımının karşılaştırılması.	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. Th1-Th2 farklılaşması.	15
1.2. TIM-3 ve galectin-9 interaksyonu.	21
1.3. TIM-3 geni polimorfizm lokalizasyonları.	24
2.1. -574 T>G polimorfizminde ARMS-PCR ile tespit edilen genotipler.	29
2.2. +4259 G>T polimorfizminde ARMS-PCR ile tespit edilen genotipler.	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı	31
3.2. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı	32

GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Astım, çeşitli uyaranlarla oluşan geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonudur. 1970' li yılların sonuna kadar, astımın temel özelliğinin bronşial düz kasların kasılması sonucu oluşan hava yolu daralması olduğu kabul edilirdi. Ancak, daha sonraları yapılan bronş biyopsisi sonuçlarına göre astım bugün, pek çok hücre ve hücre kaynaklı aktif molekül ve mediatörün rol oynadığı, hava yollarının kronik inflammatuar hastalığı olarak tanımlanmaktadır (1,2).

Astım tanısı alan çocukların çoğunun, hayatın ilk iki yılında belirti verdiği saptanır. İlk yıllarda öksürük ve hırıltının ana uyararı viral solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Bu yaşlarda akciğerlerin gelişiminin henüz tamamlanmamış olması, küçük hava yolu çaplarının dar, kıkırdak dokunun az olması, tekrarlayıcı bronş daralmasına katkıda bulunur. Dört-beş yaşlarında akciğerlerin gelişiminin tamamlanması ile erken yaşlarda astım belirtileri gösteren birçok çocukta klinik olarak düzelmeye gözlenmektedir. Düzelmeyen bir grup hasta ve daha geç astım tanısı almış çocukların bir kısmı da ergenlik çağında klinik bir iyilik dönemine girerler. Genel olarak çocukluk çağında astım tanısı almış hastaların yaklaşık %50-60' ı ergenlik döneminde iyileşirler.

Çocukluk astımı genelde erkeklerde kızlardan iki kat fazla görülmektedir. Bu oran ergenlik çağında eşitlenir. Erişkinlerde ise astım kadınlarda daha çok görülen bir hastalıktır (3,4).

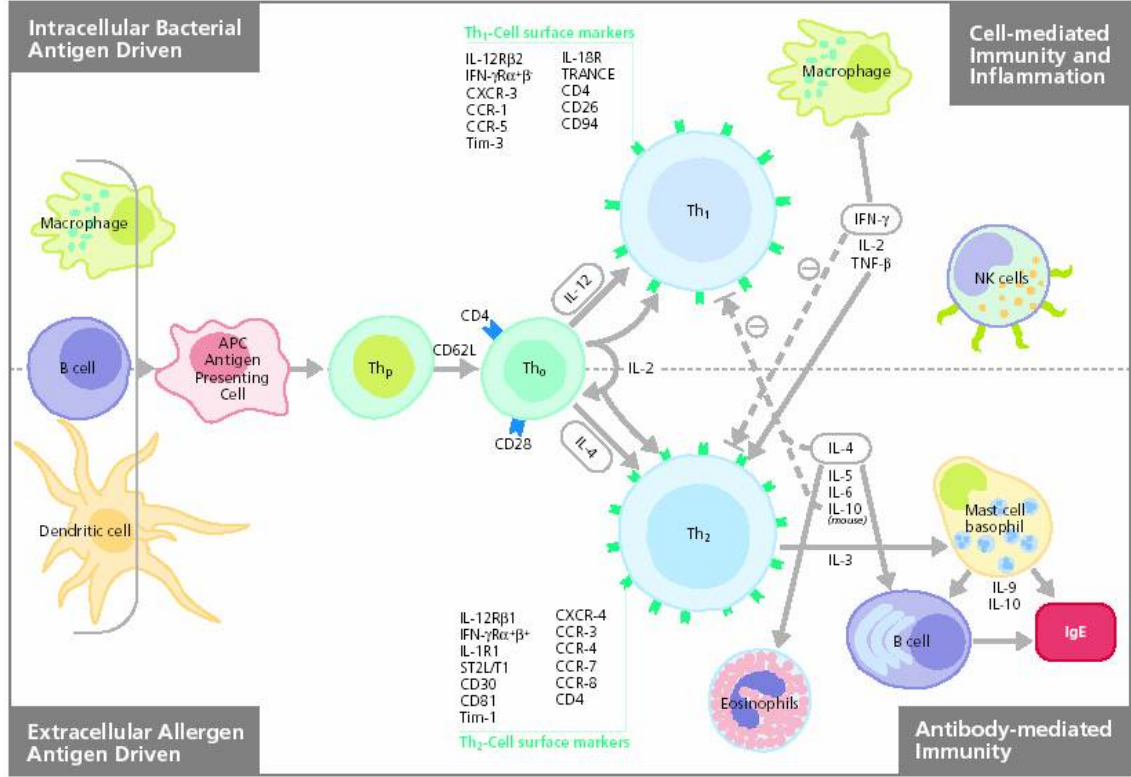
Hava yolundaki inflamasyonda; mast hücresi, eozinofil, nötrofil gibi hücreler ve bu hücrelerden salınan mediatörler (histamin, lökotrienler) ve sitokinlerin (TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF) önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Astımda erken aşırı duyarlılık, tip I reaksiyonla oluşan bir inflamasyon mevcuttur. Tip I reaksiyonda antijen, allerjendir. Antikor, IgE ve hedef hücre ise doku mast hücresidir. Allerjenler; genellikle ev tozu akarları, polenler, kedi ve köpek salgı allerjenleri, küf mantarı gibi inhale allerjenlerdir (5,6).

1.1. Th1/Th2 Farklılaşmasının Mekanizması

Organizmaya alınan allerjenin antijen sunan hücre ile karşılaşmasıyla immün yanıt başlamaktadır (Şekil 1.1). Antijen, antijen sunan hücre içinde lizozomal enzimler ile küçük peptit yapılara dönüştürüldükten sonra bölgesel lenf bezlerinde T lenfositlere sunulmaktadır.

Antijen sunumu antijen sunan hücre ile CD4+ T yardımcı hücrelerin karşılıklı olarak bir etkileşime girmeleri ile gerçekleşmektedir. Bu etkileşimin hücre içi sinyal mekanizmalarını uyarması için ayrıca aksesuar moleküllerin de devreye girmesi gerekmektedir. Bu aşamada sunulan antijenin niteliğine, ortamdaki sitokine ve kişinin genetik yapısına bağlı olarak naif Th hücreler farklı sitokin grubu sentezleyen T hücrelerine dönüşmektedirler. Bunlardan biri Th 1 lenfositler olup IL-2, TNF- α ve IFN- γ sentezlerler ve başlıca tüberküloz, lepra gibi granülomatoz hastalıklardaki gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonundan sorumludurlar.



Şekil 1.1. Th1-Th2 farklılaşması (www.bdbiosciences.com/image_library/Th1- Th2_pathway)

Th2 dönüşümü geçiren hücrelerden ise IL-4, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF salınır. Bu sitokinlerden IL-4 ve IL-13 B hücrelerden allerjen spesifik IgE sentezini düzenlerken, IL-5 allerjik inflamasyonun en karakteristik hücresi olan eozinofillerin yapımını, olgunlaşmalarını ve aktivasyonlarını artırır. IL-13'ün ise mukozal inflamasyonu, epitel hasarını, eozinofil toplanmasını, bronşiyal hiperaktiviteyi ve düz kas hipertrofisini başlatmak gibi etkileri vardır.

Th2 sitokinler allerjik inflamasyonu başlatırken, Th1 hücrelerinden salınan IFN- γ ise bu etkiyi güçlü bir şekilde antagonize eder. Bu iki grup dışında, IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri salgılayan düzenleyici T hücreleri ve

doğal düzenleyici hücreler (Treg=T regulatory) ise Th1 ve Th2 yanıtı dengesini değiştirebilen, baskılabilen hücrelerdir.

1.2. Astım Hastalığında Rol Oynayan Hücreler

Astımda allerjen organizmaya alındıktan sonra antijen sunan hücreler tarafından fagosite edilir. Antijen sunan hücre ve Th hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucu, Th0 hücreler IL-2 sentezler ve Th2' ye dönüşür. Bu hücrelerden salınan IL-4 ve IL-13 etkisi ile B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşür ve antijene özgü IgE yapımı başlar. Polenler, ev tozu gibi çoğalmayan ve çevrede yaygın olarak bulunan bu antijenlere tolerans gelişmemesi ve yanıtın aşırı ve Th2 baskın olması atopik hastalıkların temel özelliklerindedir. Neden allerjenin bazı kişilerde (Atopik= inhalan alerjenlere IgE tipi yanıt veren kişiler) Th2 baskın, aşırı yanıt oluşturduğu hala tam olarak bilinmemektedir.

Kanda dolaşan yüksek afiniteli IgE reseptörü taşıyan lenfosit, doku mast hücresi ve bazofil; düşük afiniteli IgE reseptörü taşıyan lenfosit ise eozinofil, trombosit ve makrofaja bağlanır ve birikir. Organizma aynı antijenle tekrar karşılaştığında, antijen kendine özgü antikora bağlanır. Bu bağlanmayla mast hücresinden, önceden mevcut (histamin, serotonin gibi) mediatörler ve antijen bağlanmasından sonra yapılan mediatörler (lökotrienler, prostoglandinler, kemokinler, sitokinler v.s.) degranüle olup perifere salınarak, birkaç dakikada gelişen erken faz reaksiyonuna yol açarlar. Bu mediatörlerin ortak etkileri yangıyı tetiklemeleri; düz kas kasılmasını, damar geçirgenliğini ve mukus sekresyonunu arttırmalarıdır.

Geç faz reaksiyonu ise 6-8 saat sonra gelişir. T hücresi, mast hücresi ve aktive olmuş epitel hücresinden salınan IL-3, IL-5 ve GM-CSF, kemik iliğinde eozinofil farklılaşmasına ve çoğalarak dolaşıma geçmelerine yol açar. Dolaşıma geçen eozinofil ve lökositlerin reaksiyon bölgesinde kalabilmeleri E.P. selektin, ICAM-I ve VCAM-I ile olur. Bu bölgede eozinofillerin damardan dokuya geçişi de eotaksin I, eotaksin II, eotaksin III, RANTES, MCP-3 ve MCP-4 gibi kemokinlerle sağlanır.

Eozinofil içeriğinde bulunan toksik ürünler, olayın geçtiği bölgede doku hasarına katkıda bulunur. Eozinofil içindeki MBP (Major Basic Protein), ECP (Eosinophil Cationic Protein) ve EPO(Eosinophil Peroksidase); vasküler permabilitede artışa, düz kas kasılmasına, düz kas ve mukus bezlerinde hipertrofi gibi yapısal değişikliklere yol açar. Remodeling (yeniden yapılanma) diye adlandırılan bu olaylar hava yolunun geriye dönüşü olmayan değişimine yol açar (2, 7, 8).

Astım oluşumunda alerjik reaksiyon dışında solunum yoluna etkili nöral mekanizmalar da rol oynar. Otonom sinir sistemi bronş düz kasının tonusunu, kan akımını düzenleyen bir sistemdir.

1.2.1. Astımı Tetikleyen Faktörler

a) Allerjenler: Bir hipoteze göre, duyarlı bir bireyde allerjene maruz kalma astıma doğrudan neden olmaktadır; bir diğer hipoteze göre ise genetik duyarlılığı olan kişilerdeki atopik yatkınlık astıma ve antijen duyarlılığına dolaylı olarak neden olur. Ev tozu akarı, kedi ve hamamböceği antijeni için birinci hipotez geçerli iken, çayır poleni ve mantar gibi allerjenlerde ikinci hipotezin geçerli olduğunu savunan çalışmalar vardır (10).

b) Hava Kirliliği: Hava kirliliğinin astımdaki rolü tartışmalıdır. Astım krizlerinin, hava kirliliğini oluşturan maddelerdeki (SO₂, NO₂, H₂SO₂, ozon, partiküller) artışlarla korelasyon gösterdiği kanıtlanmıştır. Hava kirliliğini yaratan faktörlerin IgE yapımını artırarak epitelde morfolojik veya fonksiyonel değişikliklere yol açarak ve allerjeniteyi artırarak etkili olduğu da gösterilmiştir (11).

c) Sigara: Anne ve babası sigara içen çocuklarda hışıltı, alt solunum yolu infeksiyonları ve astım, evlerinde sigara içilmeyen çocuklardakine göre -özellikle de hayatın ilk yılında- çok daha fazla görülür (12).

d) İnfeksiyonlar: Solunum yollarının viral enfeksiyonları hava yolları epitelinde hasara neden olarak bronşlarda inflamasyon ve obstrüksiyona yol açtıkları gibi, aeroallerjenlere sensitizasyonu da kolaylaştırır (13). Özellikle Th1 yanıtını tetikleyen enfeksiyonların azalmasının astıma yatkınlığı arttırdığını ileri süren çalışmalar da vardır (Hijyen hipotezi).

e) Allerjik Rinit: Allerjik astımlı hastaların %30' undan fazlasında mevsimsel ya da perennial rinit semptomları bulunmaktadır (14). Nonatopik astım ve rinit birlikteliğiyle ilgili veriler daha azdır. Bununla beraber, perennial rinit varlığının astım gelişimi için allerjenden bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (15). Benzer şekilde mevsimsel alevlenmelerle yıl boyu süren allerjik rinitli bireylerde astımın ortaya çıkma olasılığının çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Rinitin, nazal semptomları olmayan popülasyonla karşılaştırıldığında astım olma riskini en az 5-10 kat arttırdığı bildirilmiştir (16).

f) Besinler: Birçok yiyecek ve içeceğin astım krizlerine neden olması mümkündür ama bu durumun gerçek prevalansı belli değildir. Özellikle küçük çocuklarda inek sütü, yumurta allerjilerinin astımla ilişkisi gösterilmiştir. Ancak ileri yaşlarda besin allerjilerinin astımla ilişkileri azdır.

g) Psikolojik Etkenler: Astım atağının ortaya çıkışında fiziksel uyarılar kadar psikolojik uyarılar da etkilidir. Panik, anksiyete ve depresyon gibi emosyonel uyarılar, hiperventilasyondan dolayı hava yolu tonusunda değişiklikler meydana getirebilir (17). Bu durumda asemptomatik kronik astımda akut atak oluşabilir. Bir astım atağının ciddiyeti majör depresif bozukluğun varlığı, panik ataklar ve korku düzeyiyle de ilişkilidir. Yapılan

çalışmalarda normal sağlıklılarla kıyaslandığında astımlı hastalarda panik bozukluk, panik atak ve sosyal fobi daha sık izlenmektedir (18, 19, 20).

h) Gastroözofageal Reflü: Bronş astımı hastalarının yaklaşık %75' inde GÖR semptomlarının varlığı bildirilmiştir (21, 22). Reflü semptomu olmayan astım hastalarında ise anormal 24 saatlik özefagus içi pH ölçüm prevalansı %62 bulunmuştur (23).

1.2.2. Astım Hastalığının Genetiği

Alerjik hastalıklar poligenik kompleks hastalıklar olarak ele alınmakta ve oluşumlarında birden fazla gen ile çevresel faktörün birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (24, 25, 26). Genetik araştırmalar hastalıkların patofizyolojisinin aydınlatılıp daha etkili tedavi girişimlerinin oluşturulması açısından gerekli ve umut vericidir. Astım ve alerjiyle ilişkili genlerin saptanması, erken tanı, risk altındaki bireylere yönelik korunma stratejilerinin geliştirilmesi ve tedaviye verilen yanıtlar arasındaki bireysel farklılıkların belirlenmesi gibi oldukça önemli gelişmelere yol açacaktır. İlk gen tarama araştırması 1996 yılında yapılmış ve bu seride astımla ilişkisi muhtemel 6 lokalizasyon saptanmıştır (27).

i) Kromozom 11q: Bu kromozomun atopi ile ilgisi ilk defa 1998' de Oxford araştırma grubu tarafından ortaya konmuştur. Burada lokalize olan yüksek afiniteli IgE reseptör geni önemli bir aday genidir (26).

ii) Kromozom 6p: Burada yer alan HLA sınıf II genleri ve spesifik IgE yanıtları arasındaki ilişki birçok araştırmanın konusu olmuştur. Atopik kişilerin farklı allerjenlere duyarlı oluşlarından yola çıkılarak, özel HLA tiplerinin alerjik hastalıklar veya astımın öngörülmesinde belirleyici olabilecekleri düşünülmüştür ve ortaya konmuştur (28).

iii) Kromozom 12q: Bu bölge üzerindeki aday genler IFN- γ geni, mast hücre büyüme faktörü geni, nitrik oksit sentetaz geni, fosfolipaz A2 geni ve insülin benzeri büyüme faktör genidir (24,26,29).

iv) Kromozom 16p: Burada bulunan IL-4 reseptör geni de IL-4' ün IgE sentezindeki rolü nedeniyle atopi ve astım için önemli aday genler arasında yer almaktadır.

v) Kromozom 13: Bu kromozom üzerinde atopi, akar duyarlılığı, total serum IgA düzeyleriyle ilişkisi saptanan majör atopi lokusu olarak adlandırılan bir bölge gösterilmiştir. Söz konusu genin hümmoral immün yanıt oluşumunda düzenleyici bir rolü olabileceği veya allerjenin mukozoda karşılanmasında rol alarak hem IgA düzeylerinin hem de atopik yapı gelişimini etkileyebileceği öne sürülmektedir (24,26).

vi) Kromozom 5q31-35: Bu kromozomda astım, bronş aşırı duyarlılığı, total IgE fenotipleri ile ilişki kurulan bir bölge, IL-4 sitokin demeti bulunmaktadır.

Bu bölge IgE sentez regülasyonunda önemli role sahip olan IL-3, IL-5, IL-9 ve GM-CSF gibi sitokin genlerini içermektedir. Bu bölgedeki diğer bir ilişki de β -2 reseptör geninde bulunmaktadır. Ayrıca yine bu kromozomdaki CD14 geni ile alerjik hastalıklar arasında bir ilişki saptanmıştır (24, 25, 30, 31). Hem hava yolu hiperaktivitesinin gelişimini hem de IL-4 ve IL-13' ün üretimini kontrol eden farklı bir gen bölgesi de tanımlanmıştır bu kromozomda: T cell and Airway Phenotype Regulator (Tapr). "TAPR" yakınında KIM1sscp bölgesi bulunmaktadır ve KIM1sscp, KIM1 (Rattus norvegicus kidney injury molecule)' in faredeki homoloğunun intronik belirteçidir.

1.3. TIM Gen Ailesinin Tanımlanması

KIM1sscp ile TAPR' in genetik lokalizasyonları oldukça yakındır. Kim1sscp' nin yakınında immünolojik olarak ilgi çekici genler bulunmaktadır ki bunlar T hücre farklılaşmasında rol oynayan itk (IL-2 inducible T cell kinase) ve Crsp9' dur (SP-1 transcription factor' ün düzenleyicisi) (32,33). Kim1' in insandaki en yakın homoloğunun "HAVcr1" olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgede yapılan araştırmalar sonucunda HAVcr1 benzeri üyelerden oluşan bir protein ailesi tanımlanmıştır. Yapılarından esinlenilerek bu aileye TIM (T cell Ig and mucin domain containing proteins) adı verilmiştir.

Farede 8 (TIM-1_8), insanda 3 üyesi (TIM-1,3,4) tespit edilmiş bu gen ailesi fare kromozomunda 11.B.1 ve insan kromozomunda 5q33.2' de lokalize durumdadır (34,35).

Bu ailenin üyeleri, benzer yapılardan oluşmuş tip 1 membran proteinleridir. İmmünoglobulin değişken zincirine benzer bir domain, müsin benzeri domain, transmembran bölgesi ve intraselüler kuyruk içermektedirler.

1.3.1. TIM-1

Fare TIM-1' i 305 aa.lık bir proteini kodlar. İlk olarak Afrika yeşil maymununda tanımlanmıştır. Sıçan Kim-1' i ile %78, insan HAVcr1' i ile %42 oranında benzerlik göstermektedir. TIM-1' in sitoplazmik bölgesi iki tirozin residüsü ve yüksek olarak korunmuş tirozin kinaz fosforilasyon motifi (RAEDNY) içermektedir (36,37).

276. rezidüsündeki tirozin, src kinazlar tarafından fosforillenme için uygun bir bölgedir ve rodent ve primatlardaki TIM-1 ortologlarında da bu bölgenin korunmuş olması, önemine işaret etmektedir. TIM-1, efektör T hücre farklılaşmasında; IL-4 promotörünün ve NFAT/AP-1 transkripsiyon faktörünün TCR bağımlı aktivasyonunda önemli bir eş uyarıcı moleküldür (38).

"CD4+ T hücre ve Tim-1 hepatit A enfeksiyonları sırasında atopi gelişimine karşı birlikte koruyucu bir etki yönetiyor olabilir." hipotezi, son 20 yılda gelişmiş ülkelerde hepatit A enfeksiyonlarının prevalansının düşüşü ve astım prevalansının artışı önemli ölçüde açıklar gibi görünmektedir (34).

1.3.2. TIM-4

Diğer TIM üyelerinden farklı olarak TIM-4, yüzeyinde CD11b+ ve CD11c+ gösterimi olan APC populasyonlarında eksprese olmaktadır. Diğer bir adı da SMUCKLER' dir (spleen, mucin-containing knock-out of lymphotaxin) (39). Sitoplazmik domaininde tirozin içermezken diğerlerininkinden uzun bir müsin domainine ve IgV domaininde RGD (arginine-glycine-aspartate) sekansına sahiptir (35). Doğal ligandı olan Tim-1' le interaksiyonu T hücrelerin efektör fonksiyonlarını ve çoğalmalarını düzenleyici etki etmektedir (40).

1.3.3. TIM-2

Tim-2 305 aa.lik membran proteinidir ve fare Tim-1' yle %64, sıçan Kim-1' yle %60 ve insan HAVcr1' yle %32 oranında benzerlik göstermektedir. TIM-1 gibi TIM-2 de iki ekstraselüler N-bağımlı glikolizasyon bölgesi içermektedir. Müsin domaininde de oksijen bağımlı glikolizasyon bölgeleri bulunmaktadır. TIM-2 farklı olarak intraselüler tirozin kinaz fosforilasyon motifi, RTRCEDQVY içermektedir. T hücrelerin farklılaşmasını ve aktivasyonunu arttıran class IV semaphorin Sema4A, ligandı olarak tanımlanmıştır (41).

1.3.4. TIM-3

TIM protein ailesinin diğer üyesi Tim-3, 281 aa.lik Th1 spesifik hücre yüzey proteinidir. Müsin domaini diğerlerininkinden kadar uzun değildir ve dört adet N-bağı ve beş adet o-bağı glikolizasyon bölgesi içermektedir. İntraselüler domaininde tirozin fosforilasyon motifi, RSEENIY bulunmaktadır (42).

Tim-3, Th1 hücreye farklılaşma aşamasından sonra yüzeyde gösterilmekte ve tercihen insan Th1 hücrelerde eksprese olmaktadır. Çok daha az oranda Th17 hücrede rapor edilmiştir (43).

1.3.4.1. TIM-3'ün Ligandı Galectin-9

Tim-3' ün çözünebilir (soluble) ve çözünemeyen (full length) olmak üzere iki formu bulunmaktadır (44). Her iki formu da insan Fc' sine bağlanarak füzyonlar oluşturulduğunda bu proteinlerin makrofaj, DC gibi hücrelere ama en çok da naif Th hücrelere bağlandığı gözlenmiştir (45). Bu konudaki detaylı çalışmaların sonucunda TIM-3' ün ligandı, Galectin-9 olarak tanımlanmıştır. Bir β -galaktosid bağlama lektini olan Gal-9 (46, 47) N ve C-terminal karbonhidrat tanıma domainleri taşımaktadır (48, 49) ve bu domainler ara peptidle birbirlerine bağlı durumdadır (50,51).

Galectin üyeleri hücre aktivasyonu, proliferasyon, adezyon ve apoptozis gibi biyolojik fonksiyonları düzenlemektedirler (52,53).

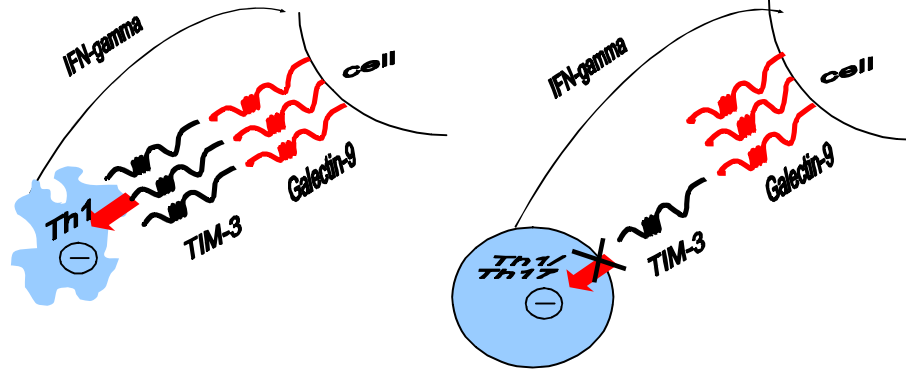
Gal-9 hücre agregasyonunda rol oynamaktadır ve eozinofiller için kemoatraktanttır. Fare timosit ve T hücrelerinin ve insan melanom hücrelerinin apoptozisinde de rol oynamaktadır (54, 55, 56). Gal-9' un apoptozisi Ca²-calpain-caspase 1 yolağını kullanarak gerçekleştirdiği ve insan periferik CD4+ T hücrelerinin apoptozisini indüklemeye oranının CD8+ T hücrelerden fazla olduğu da gösterilmiştir (57).

Yüksek seviyedeki Gal-9 ekspresyonu, melanomalı insanlarda yaşam süresinin uzaması ve uzak metastazların frekansının azalmasıyla ilişkili bulunmuştur. Melanoma hücresinde Gal-9 sadece hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Dışarıdan verilen rekombinant Gal-9, melanoma hücresinin agregasyonunu laktoza duyarlı olması yoluyla indüklemektedir (56).

1.3.4.2. TIM-3 ve Galectin-9 Yolağı

Gal-9, TIM-3 bağımlı olarak intraselüler Ca⁺ akışını indükleyerek Th1 hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Sadece antijene spesifik Th1 hücresini hedef almaktadır. Yani tüm periferik T hücreleri değil, aktive olmuş Th1 hücreleri apoptozise götürmektedir.

Gal-9' un in vivo uygulanmasıyla IFN- γ üreten hücrelerin sayısının azaldığı ve Th1 hücrelerin temel rol oynadığı otoimmünitenin baskılandığı gösterilmiştir.



Şekil 1.2. TIM-3 ve galectin-9 interaksyonu(66)

Tim-3 yolağı Th1 immün cevapların spesifik inhibitörüdür ve periferik toleransın indüklenmesinde de önemli role sahiptir. Bu yolak anti-Tim-3 antikoru ya da Tim-3-Ig füzyon proteini kullanılarak bloke edildiğinde tolerans indüksiyonunun kaybolmasına ilaveten Th1 hücrelerin proliferasyonunun ve de sitokin (özellikle IFN- γ) cevabının arttığı rapor edilmiştir (44, 45). Makrofaj aktivasyonu ve ekspansiyonun arttığı da bilinmektedir (42). Efektör Th1

spesifik hücelere yönelik olarak, tıpkı inhibitör bir eş uyarıcı molekül olan CTLA-4 gibi rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Tim-3 ve Gal-9' un, Th1 hücelerin ölümüne sebep olan sinyal yolağı incelendiğinde Tim-3' ün intraselüler kuyruğunda yüksek olarak korunmuş tirozin içeren SH2 bağlanma motifi Y265' i taşıdığı görülmüştür. Y265 spesifik olarak itk tarafından fosforillenmektedir. Itk' nın aktinin reorganizasyonu ve T hücre farklılaşmasında rol oynadığı, TIM protein ailesi gibi alerjiye yatkınlık lokusunda lokalize olduğu da bilinmektedir (58). Bu konuda yapılmış bir çalışmada TIM-1ve TIM-3 genlerindeki polimorfizmlerle ITK' nın birbirinden ayrı olarak atopi, astım ve ekzemayla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (59).

Tim-3' ün tümör immün tolerans indüksiyonundaki rolü RT-PCR ile araştırıldığında tümör gelişiminin erken safhalarında görülen sTim-3 ekspresyonunun, fTim-3 ekspresyonu başladığında baskılandığı gösterilmiştir. Bu aşamada Foxp3 ve GTR da tümörün büyümesiyle birlikte artış göstermektedir. Yani tümörün büyüme sürecinde fTim-3, Foxp3 ve CTLA-4 ekspresyonu artış gösterirken sTIM-3 ekspresyonu azalmaktadır (60).

Reseptörlerin çözünebilir molekülleri otoimmün hastalıklara yatkınlık ve dirençte önemlidir (61). Çözünebilir Tim-3' ün müsin domaini ve transmembran bölgesinin bulunmadığı yani Tim-3' ün immün düzenleyici aktivitesinin önemli oranda onun immünoglobulin domaini yoluyla olduğu gösterilmiştir (44).

sTim-3' ün fonksiyonu araştırılmış; mRNA' sının yalnızca dalak hücelerinde bulunduğu ve bu hücelerin aktivasyonunun sTim-3' ün mRNA ve protein miktarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tümör atılım modelinde sTim-3' ün, T hücre antitümör immünitesini önemli ölçüde baskıladığı yönünde veriler elde edilmiştir. Tümörün yakın çevresindeki genlerin ekspresyonu RT- PCR ile incelendiğinde Th1 sitokin genlerinin ekspresyonunun azaldığı ve Treg hücre fonksiyonuyla ilgili genlerin profilinin değişmediği gösterilmiştir. Bu veriler ışığında sTim-3' ün, T hücre yönetimli immün cevabın negatif düzenlenmesinde görevli bir molekül söylenmiştir (62).

BALB/c farede viral enfeksiyona doğal immün yanıt sırasında Tim-3 sinyalinin azalmasının, mast hücresi ve makrofajlar üzerinde CD80 eş uyarıcı molekülünün ekspresyonunun ve CD4+ T hücresinde doğal CTLA-4 seviyesinin azalmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir.

Viral enfeksiyonların indüklediği otoimmünitede Tim-3' ün negatif düzenleyici immün cevabıyla ilgili olarak ayrıca APC üzerinde B7-1' in ve T hücrede CTLA-4' ün gösteriminin Tim-3 bağımlı olarak arttığı rapor edilmiştir (63).

İnsanda TIM-3' ün fonksiyonunu açıklamak için yapılan bir çalışmada MS hastaları ve kontrol grubunun beyin-omurilik sıvılarından elde edilmiş T hücreleri kullanılarak Tim-3 ve IFN- γ ' nın sekresyonlarının düzeyleri karşılaştırılmıştır. MS hastalarının klonları daha az Tim-3 ekspresyonu ve daha fazla IFN- γ ekspresyonu göstermesinden yola çıkılarak MS CSF klonlarında Tim-3 ekspresyonunun düzensiz olduğu ileri sürülmüştür (64).

siRNA kullanılarak Tim-3' ün ekspresyonu azaltıldığında hücre uyarımından sonra T hücre proliferasyonu ve IFN- γ sekresyonunun arttığı gösterilmiştir (65). Bu noktada MS hastalarındaki patojenik oтореaktif T hücrelerinin temelinde belki de bu hücrelerdeki bir defektten kaynaklanan düzensiz Tim-3 ekspresyonundan söz edilebileceği ileri sürülmüştür (66).

1.3.4.3. TIM-3 Genindeki Polimorfizmler

Artmış AHR ile karakterize Th2 ağırlıklı immün cevap geliştiren BALB/c fare ve azalmış IL-4 üretimi gösteren HBA farelerin TIM-3 aa. sekansları karşılaştırıldığında yedi pozisyonda 4 aa. farklılığı tespit edilmiştir. Fare ile insandaki polimorfik bölgelerin farklı olduğu da bildirilmiştir (34).

TIM-3 geninin bildirilmiş dört tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır (Ek-3) Bunlardan üçü promotör bölgesinde bulunmaktadır. Bunlar: -1541 C>T, -1516 G<T ve -574 T>G. Promotör bölgesinde oluşabilecek bir değişiklik genin transkripsiyon faktörlerinin bağlanma durumunu etkileyebileceği için fonksiyonunda etkili olma ihtimali vardır. Nitekim -1516 G>T polimorfik bölgesi p300' ün olası transkripsiyonel bağlanma bölgesinde lokalize olmuş durumdadır. Ekson 3' te ise bir aa. değişikliğine sebep olan 4259 G>T polimorfizmi gösterilmiştir.

TIM-3 geninin 3. exonunda bulunan 4259 G>T polimorfizmi, arjininin lösine dönüşümüne sebep olmaktadır. Müsin domainindeki bu polimorfizmin yapısal bağlanmada önemli olduğu ileri sürülmüştür (67).

RA hastalarının TIM-3 genindeki polimorfizmlere ait genotip frekansları kontrollerin genotip frekanslarıyla karşılaştırılmış ve bu genotiplerle CRP ya da RF seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuçta net bir ilişki bulunamamakla birlikte; -574 T>G ve 4259 G>T polimorfizm dağılımları RA hastalarında genotip ve allel frekansları düzeyinde incelendiğinde bu polimorfizmlerin RA' ya yakınlıkla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (68).

TIM-3' ün major polimorfizmlerinin Th1/Th2 farklılaşması ve konjenik farede hava yolu hiperaktivitesinin ekspresyonuyla kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (34). TIM-3' ün -574 T>G ve 4259 G>T polimorfizmlerinin astım ve allerjik rinit gibi atopik hastalıklara yakınlıkla ilişkili olduğuna dair yayınlar da bulunmaktadır (69).

Çin' de yapılmış bir çalışmada promotör bölgesindeki iki polimorfizmin allerjik rinitle ilişkisi araştırılmıştır. PCR-RFLP ve ASPCR ile elde edilen

sonuçlar genotip ve allel frekansları açısından değerlendirildiğinde -1541 C/T polimorfizmi ile bir ilişki saptanmazken -574 G/T polimorfizmi alerjik rinite yatkınlıkla ilişkili bulunmuştur (70).

OLGULAR ve YÖNTEM

2.1. Olgular

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D.' nda astım tanısıyla izlenen hastalar alınmıştır. Kontrol grubu ise çocuk acil servisine başvurmuş, kendisinde ve ailesinde alerji öyküsü olmayan bireylerden oluşturulmuştur.

-574 T>G polimorfizmi için genotiplendirilen kontrol grubunun (n=75) %42' si kız, %58' i erkek olup yaş ortalamaları 8' dir. Hasta grubunun (n=66) ise %41' i kız, %59' u erkekten oluşmuştur.

4259 G>T polimorfizmi için genotiplendirilen kontrol grubunun (n=91) %43' ü kız, %57' si erkek olup yaş ortalamaları 8' dir. Hasta grubunun (n=76) %40' ı kız, %60' ı erkektir.

2.2. DNA İzolasyonu

Astım tanısıyla izlenen bireylerden ve kendisinde ya da ailesinde allerji öyküsü olmayan bireylerden EDTA içeren tüplere 1 cc venöz kan alınmış ve DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Gentra DNA Ekstraksiyon kit kullanılarak yapılan DNA izolasyon yöntemi, aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

- 300 µl. kan, 900 µl "red blood cell lysis" ile karıştırıldı. 15 dk. oda ısısında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- 1750 g. de 1 dk santrifüj edildi (Heraeus marka Megafuge 1.0R). Süpernatant atıldı.
- Dipte kalan hücreler 300µl "cell lysis" solüsyonu ile karıştırıldı.
- 100 µl "protein precipitation" solusyonu da eklendi ve 15 sn. vorteks ile iyice karışması sağlandı. 1750 g. de 1 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 300 µl. isopropanol ilave edildi. Tüp elle sallanarak DNA' nın kondanse hale gelmesi sağlandı.
- 1750 g. de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 300 µl %70' lik etil alkol eklenip karıştırıldı.
- 1750 g. de 1 dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı.

- i) Dipte kalan DNA 100 µl “dehidratation” solüsyonu ile sulandırıldı.
- j) Çalışma başlayana kadar -30 °C’ de bekletildi.

İzole edilmiş olan DNA örnekleri TIM-3 -574 T>G ve +4259 G>T polimorfizmleri açısından bireylerin genotiplendirilmesi için kullanıldı.

2.3. ARMS-PCR

Polimorfizmlerin belirlenmesinde ARMS-PCR tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte oligonüklotidlerden (primer) birinin 3’ ucunun en son bazı yabancı tipe uyumlu, diğeri ise polimorfizmde veya mutasyonda görülen değişikliğe uyumludur. PCR sırasında bağlanma ısısı çok yüksek tutulduğundan, ancak oligonükleotid ile kalıp DNA arasında tam uyum varsa oligonükleotidin dizine yapışması ve daha sonra amplifikasyonu başlatması mümkün olur. Bu sistemde, bir başka genin amplifikasyonu da paralel olarak yapılır. Dolayısı ile bir iç kontrol sağlanmış olur. Bu çalışmada iç kontrol olarak b-aktin geni kullanılmıştır.

2.3.1. TIM-3 Geni -574 T > G Polimorfizminin Araştırılması (rs:10515746)

Kullanılan primerler: (GeneBank acc. No: NM_ 023133)

Reverse T: 5'- GAA GGA TGA GAG TGA GGC TTA TGC TGG GAG TTG CT-3'

Reverse G: 5'- GAA GGA TGA GAG TGA GGC TTA TGC TGG GAG TTG CG-3'

Forward: 5'- CTC AGT CAT GGC ACA TAA AGA GAA CCC TCT-3'

PCR ürünü 290 bp büyüklüğündedir. (EK-4)

Kullanılan primerler: (GeneBank acc. No:NM_ 001101)

b-Actin forward: 5'-GGA GCA CGG CAT CGT CAC CAA CT-3'

b-Actin reverse: 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TCT CA-3'

PCR ürünü 184 bp büyüklüğündedir. (EK-6)

PCR için kullanılan kimyasallar tablo 2. 1.'de özetlenmiştir.

PCR koşulları:

95° C (denatürasyon)	30 sn	} 35 döngü
66° C (bağlanma)	30 sn	
72° C (uzama)	1 dk	

PCR için DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer) cihazı kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %2' lik agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra jel etidium bromide (10mg/ml) ile boyanarak jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat) görüntülendi. Sadece G aleli için PCR ürününün bulunması durumunda genotip GG; sadece T aleli için PCR ürününün bulunması durumunda ise genotip TT olarak ifade edildi. Her iki alel için PCR ürününün bulunması halinde genotip GT olarak değerlendirildi (Şekil-2.1.).

Tablo 2.1. -574 T>G TIM-3 ARMS-PCR için kullanılan malzemeler

PCR	T tüpü	G tüpü
Forward primer	0.1µM	0.1µM
Reverse G primer	---	0.1µM
Reverse T primer	0.1µM	----
b-Actin F primer	0. 5µM	0. 5µM
b-Actin R primer	0. 5µM	0. 5µM
dNTP	0.2mM	0.2mM
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
Buffer	1X	1X
Taq. Pol	1.25 U	1.25 U
Kalıp DNA	30 ng	30 ng
H ₂ O	17.6µl	17.6µl
Toplam hacim	25µl	25µl

2.3.2. TIM-3 Geni +4259 G > T Polimorfizminin Araştırılması (rs:1036199)

Kullanılan primerler: (GeneBank acc No:NM_ 032782)

Forward G; 5'- AAG GTC ACC CCT GCA CCG ACT CG- 3'

Forward T; 5'- AAG GTC ACC CCT GCA CCG ACT CT -3'

Reverse; 5'- CCA GAG CCA GCC CAG CAC AG- 3'

PCR ürünü: 250 bp. (EK-5)

Kullanılan primerler: (GeneBank acc. No:NM_ 001101)

b-Aktin Forward : 5'- CGA GCA CGG CAT CGT CAC CAA CT-3'

b-Aktin Reverse: 5'- TGG CTG GGG TGT TGA AGG TCT CA-3'

PCR ürünü: 184 bp. (EK-6)

PCR için kullanılan kimyasallar tablo 2. 2.'de özetlenmiştir.

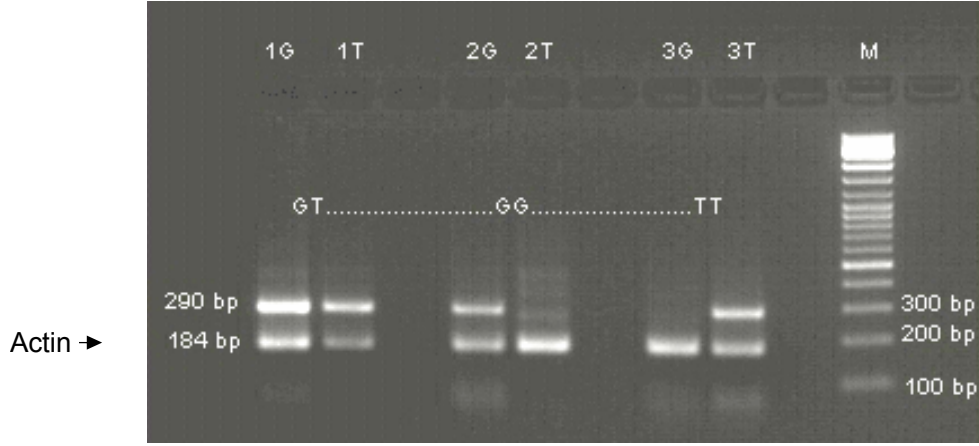
Tablo 2.2. +4259 G>T TIM-3 ARMS-PCR için kullanılan malzemeler

PCR	G tüpü	T tüpü
Forward primer	0.12µM	0.12µM
Reverse G primer	0.12µM	----
Reverse T primer	----	0.12µM
b-Actin F primer	0.12µM	0.12µM
b-Actin R primer	0.12µM	0.12µM
dNTP	0.4mM	0.4mM
MgCl ₂	2mM	2mM
Buffer	1X	1X
Taq. Pol	1.25 U	1.25 U
Kalıp DNA	30 ng	30 ng
H ₂ O	16.35 µl	16.35 µl
Toplam hacim	25µl	25µl

PCR koşulları:

95° C	5 dk	1 döngü
95° C	30 sn	} 35 döngü
66° C	45 sn	
72° C	1 dk	
72° C	5 dk	1 döngü

PCR için DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer) cihazı kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %2' lik agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra jel etidium bromide (10mg/ml) ile boyanarak jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat) görüntülendi. Sadece G aleli için PCR ürününün bulunması durumunda genotip GG; sadece T aleli için PCR ürününün bulunması durumunda ise genotip TT olarak ifade edildi. Her iki alel için PCR ürününün bulunması halinde genotip GT olarak değerlendirildi (Şekil-2.2.).

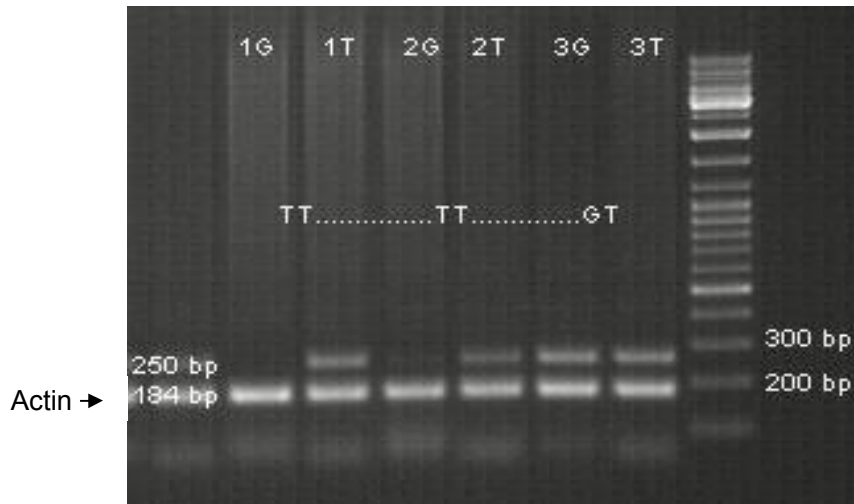


Şekil 2.1. -574 T>G polimorfizminde ARMS-PCR ile tespit edilen genotipler

Olgu1: GT genotipine sahip.

Olgu2: GG genotipine sahip.

Olgu3: TT genotipine sahip.



Şekil 2.2. +4259 G>T polimorfizminde ARMS-PCR ile tespit edilen genotipler

Olgu1: TT genotipine sahip.

Olgu2: TT genotipine sahip.

Olgu3: GT genotipine sahip.

BULGULAR

3.1. -574 T>G TIM-3 Polimorfizminin ARMS-PCR Sonuçları

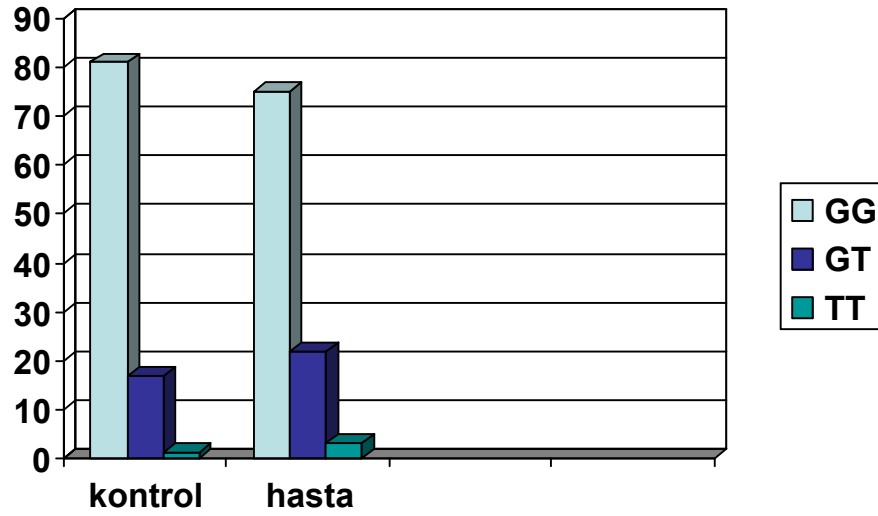
Çalışmaya alınan 66 hasta ve 75 kontrole ait TIM-3 geninin promotor bölgesindeki -574 gen polimorfizmine ait sonuçlar Tablo 3.1.' de özetlenmiş, çizelge 3.1.'de şematize edilmiştir. Sonuçların istatistiksel testlerini yapmak için <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> adresi kullanılmıştır. Bulunan tüm genotip frekansları Hardy-Weinberg dengesi açısından test edilmiş ve sınırlar içinde oldukları tespit edilmiştir. Astım ve sağlıklı kontroller arasındaki genotip ve allel karşılaştırmaları Fisher's exact test kullanılarak yapılmıştır. Lojistik regresyon analizi, odds ratio (%95 CI) tespiti için kullanılmıştır (Tablo 3.2.).

3.2. +4259 G>T TIM-3 Polimorfizmlerinin ARMS-PCR Sonuçları

Çalışmaya alınan 76 hasta ve 91 kontrole ait TIM-3 proteininin 3. exonunda bulunan +4259 gen polimorfizmine ait sonuçlar Tablo 3.3.' de özetlenmiş, çizelge 3.2.' de şematize edilmiştir. Bulunan tüm genotip frekansları Hardy-Weinberg dengesi açısından test edilmiş ve sınırlar içinde oldukları tespit edilmiştir. Astım ve sağlıklı kontroller arasındaki genotip ve allel karşılaştırmaları Fisher's exact test kullanılarak yapılmıştır. Lojistik regresyon analizi, odds ratio (%95 CI) tespiti için kullanılmıştır (Tablo 3.4.).

Tablo 3.1. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı

Pozisyon	Genotip/Alel	Kontrol	Astım	p değeri	Odds ratio
		n(%)	n(%)	Astım	(%95CI)
-574 T>G	TT	1 (1)	2 (3)	0.34	1.421 (0.685-2.946)
	TG	13 (17)	14 (21)		
	GG	61 (81)	50 (75)	0.36	
	T	15(10)	18(12)		
	G	135(90)	114(88)		



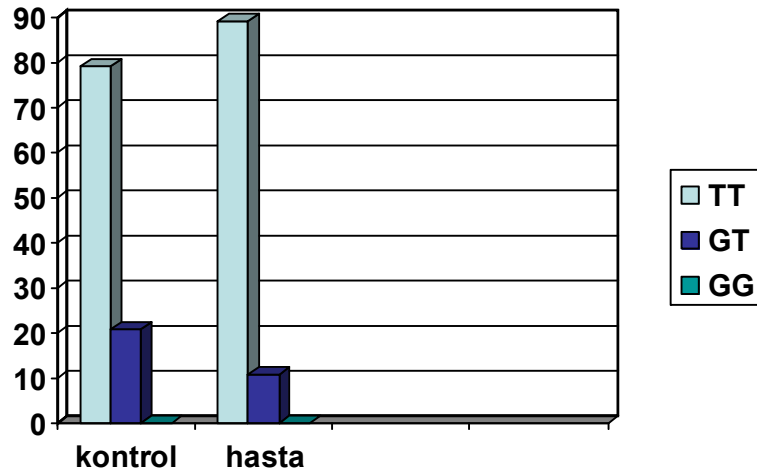
Çizelge 3.1. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı

Tablo 3.2. -574 T>G TIM-3 Genotiplerinin biriktelik testleri (%95 CI)

G<>T	GG<>GT	GG<>TT	GG<>GT+TT	odds ratio
p=0.34	p=0.52	p=0.45	p=0.41	1.432
T<>G	TT<>GT	TT<>GG	GG+GT<>TT	odds ratio
p=0.34	p=0.62	p=0.45	p=0.48	0.708

Tablo 3.3. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı

Pozisyon	Genotip/Alel	Kontrol	Astım	p değeri	Odds ratio
		n(%)	n(%)	Astım	(%95 CI)
-4259 G> T	TT	72 (79)	67 (89)	0.13	0.540 0.237-1.231
	GT	19 (21)	9 (11)		
	GG	0 (0)	0(0)		
	T	163(89.5)	143(94)	0.1	
	G	19(10.5)	9(6)		



Çizelge 3.2. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin astım hastaları ve kontrollerdeki dağılımı

Tablo3.4. +4259 G>T TIM-3 Genotiplerinin birliktelik testleri (%95 CI)

T<>G	TT<>TG	TT<>GG	TT<>TG+GG	odds ratio
p=0.13	p=0.11	p=1	p=0.11	0.509

G<>T	GG<>TG	GG<>TT	TT+TG<>GG	odds ratio
p=0.13	p=1	p=1	p=1	1.651

TARTIŞMA

Kısa bir süre önce, T hücre yüzeyinde eksprese edilen bir protein ailesi tanımlanmıştır. Bu ailenin insanda tespit edilmiş üç üyesinden biri olan TIM-3, tamamen Th1' e farklılaşmış hücrede eksprese olmaktadır. Th1 yönetimli immün cevaplarda ve makrofaj aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (42).

Th1/Th2 farklılaşmasında Tim-3 ve ligandının etkileşiminin oluşturduğu sinyalin yeri ve önemi düşünülecek olursa Tim-3' ün fonksiyonunun bozulmasının sonuçlarının da immün sistemin dengesinde etkili olacağı açıktır. Th1 hücrelerin çoğalmasıyla yönetilen bir immün cevap, IFN- γ ' nın üretiminin artmasıyla devam eder. Bu sitokinin etkisiyle T hücre yüzeyinde Galectin-9 ekspresyonu artar ve Tim-3 ile bağlanarak hücreyi apoptozise götürür. Böylece Th1 cevabı sınırlandırılmış olmaktadır. Bu sınırlandırıcı sinyalin dengesinin bozulması immün yanıtı da etkileyerek atopi ya da otoimmüniteye yatkınlık sonucunu doğurabilecektir. Hala cevaplanması gereken birçok soru içeren bu yeni konuda şimdiye kadar TIM-3 geninin polimorfizmlerinin fonksiyonuna etkisini göstermeye yönelik yayın sayısı oldukça azdır.

Biz bu çalışmada TIM-3 geninin kodlama ve promotor bölgelerinde bildirilmiş tek nükleotid polimorfizmlerinden ikisinin Türk toplumundaki atopi ile ilişkisini araştırdık.

Daha önce TIM-3 geninin promotor bölgesinde tespit edilmiş -574 T>G polimorfizmi ile allerjik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran Chae ve arkadaşlarının (68) çalışmasında astım (n=253, p=0.042) ve allerjik rinitle (n=201, p=0.008) bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Aynı grubun RA hastalarında yaptıkları araştırmada da kuvvetli bir ilişki gösterilmiştir (n=295, p=0.001) (69). Çin'de yapılmış başka bir çalışmada da astımla bu polimorfizm ilişkili bulunmuştur (p=0.046) (70). Biz bu olgu kontrol çalışmasında -574 T>G polimorfizmi için GG, GT ve TT genotip frekanslarını kontrol grubunda sırasıyla 0.81, 0.17 ve 0.01; hasta grubunda ise 0.75, 0.22 ve 0.03 olarak gördük (p=0,34; Odds oranı=1,43) ve çocukluk çağı astımı ile bir ilişki görmedik. Çalışmamızda daha önce konuyla ilgili yayınlarda bildirilmemiş olan homozigot mutant TT genotipine sahip iki bireye rastlanmıştır. Bu bireylerin genotipleri tekrar PCR yapılarak değerlendirilmiş de olsa sonucun kesinleştirilmesi için sekans analizi yapılması gerekmektedir. Ayrıca bu polimorfizmin tespitinde kullandığımız ARMS-PCR metodunun uygulanmasındaki zorluk ve çeşitli aksaklıklar nedeniyle hedeflenenenden daha az sayıda birey çalışmaya alınabilmiştir.

İncelediğimiz diğer bir polimorfizm olan +4259 G>T, TIM-3 geninin 3. eksonunda lokalizedir ve aa. değişimine (Arg140Leu) neden olmaktadır. Müsin domainindeki bu polimorfizmin yapısal bağlanma ile ilgisi olabileceği ileri sürülmüştür (67). Daha önce bu polimorfizmle allerjik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran Chae ve arkadaşlarının (68) çalışmasında astımla bir ilişki gösterilmezken (n=254,p=0.975), allerjik rinitle ilişkili olduğu gösterilmiştir (n=201, p=0.057). Aynı grubun RA hastalarında yaptıkları araştırmada da kuvvetli bir ilişki gösterilmiştir (n=296, p=0.001) (69). Biz bu olgu kontrol çalışmasında +4259 G>T polimorfizmi için TT, GT ve GG genotip frekanslarını kontrol grubunda sırasıyla 0.79, 0.21 ve 0.0; hasta grubunda ise 0.89, 0.11 ve 0.0 olarak tespit ettik. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla bu polimorfizmin çocukluk çağı astımıyla ilişkili olmadığını gördük (p=0,13; Odds oranı=0,540).

Bu çalışmada ortaya koyduğumuz TIM-3 geninin polimorfik -574 bölgesine ait genotip dağılımları daha önce bildirilmiş dağılımlardan farklıdır. Çalışmamızda genotiplendirebildiğimiz olgu sayısının az olması bu farkı oluşturan bir faktör olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca toplumumuz diğer çalışmalardaki ırklardan farklı olduğu için de bu sonuçları gözlemlememiz normal karşılanabilir. Farklılık nedeni olabilecek bir başka faktör de olguların yaş gruplarıdır. Bizim çalışmamızdaki olgular çocukluk çağı astım grubundan oluşurken diğer çalışmalar yetişkin gruplarını kapsamaktadır.

+4259 G>T polimorfizmine ait genotip dağılımında "TT" ve "GT" genotiplerine sahip bireylere rastlamamıza rağmen "GG" genotipinde birey tespit edememiş olmamızın sebebi de yine olgu sayımızın azlığıdır.

Elde ettiğimiz verileri toplumumuz açısından değerlendirmemizi ve karşılaştırmamızı sağlayacak bir benzeri olmadığı için verilerimizi Kore' de ve Çin' de yapılmış çalışmada ortaya çıkmış sonuçlarla kıyasladık.

TIM-3 genindeki polimorfizmlerin Türk toplumunda ilk kez araştırıldığı bu çalışmada +4259 G>T polimorfizmindeki genotip dağılımının Kore toplumuna benzerlik gösterdiği görülmektedir (67, 69) (tablo-4.1.).

Pozisyon	genotip	Kore1	Kore2	Türk
+4259 G>T	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	GT	0 (0)	63 (19.7)	19 (21)
	TT	24 (100)	256 (80.3)	72 (79)

Tablo 4.1. +4259 G>T polimorfizmindeki genotip dağılımının karşılaştırılması.

TIM-3 geninin promotor bölgesindeki -574 T<G polimorfizmine ait genotip dağılımının Kore toplumundan farklılık göstermesi, polimorfik olan 'T' allelinin Türk toplumunda rastlanabilen bir allel olduğu gerçeğinden kaynaklanmaktadır (tablo-4.2.).

Pozisyon	genotip	Kore1	Kore2	Çin	Türk
-574T>G	TT	0(0)	0(0)	0	1 (1)
	TG	2 (8)	0(0)	(0.8)	13 (17)
	GG	22 (92)	319 (100)	(99.2)	61 (81)

Tablo 4.2. -574 T<G polimorfizmindeki genotip dağılımının karşılaştırılması.

SONUÇLAR

Bu çalışmada Türk populasyonundaki astım hastalarında TIM-3 geninde bulunan iki polimorfizm çalışılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. TIM-3 geninin promotor bölgesinde bulunan -574 T<G polimorfizmi için, genotip dağılımları açısından astımlı hastalar ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edilmiştir.
2. TIM-3 geninin -574 T<G polimorfizminde toplumumuzdaki genotip dağılımı Kore ve Çin toplumlarından farklılık göstermektedir.
3. TIM-3 geninin 3. eksonunda bulunan +4259 G>T polimorfizmi için, genotip dağılımları açısından astımlı hastalar ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edilmiştir.
4. TIM-3 geninin +4259 G>T polimorfizminde toplumumuzdaki genotip dağılımı Kore toplumuna benzer bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Kline MA. Pathogenesis of Asthma. In: Flesher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W (eds). Clinical Immunology Principles and Practise. St. Louis: Mosby 1996; 909-923.
2. Global Strategy for Asthma Management and prevention. Mechanism of Asthma. National Institutes of Health NIH Publication no: 02-3959; 2002;50-56.
3. Aberg N, Lundback B, Möller C, et al. Threefold increase of asthma and allergic rhinitis in Swedish military recruits between 1971 and 1992. Allergy 1996;51(suppl):31:12.
4. Clifford RD. Radford M, Howell JB, Holgate ST. Prevalance of respiratory symptoms among 7 and 11 year old school children and association with asthma. Arch Dis Child 1989;64:1118-1125.
5. Sly MR. Asthma. In: Nelson Textbook of Pediatrics. Behrman RE, Kliegman RE, Nelson WE, Vaughan VC. WB Saunders Company 1996;628-641.
6. Akçakaya N, Kulak K, Hassanzadeh A, Camcıoğlu Y, Çokuğraş H: Latex allergy the incidence among Turkish children with atopic disease and with neural tube defects. Allergol Immunopathol 1999;27:141-144.
7. Miller S, Buse WW, Holgate ST. Cellular and mediator mechanism of allergic inflammation. In: Halgate ST, Churc MK, Lichtenstein ML (eds). Allergy 2nd ed. London. Mosby International Ltd. Harcourt Pub Ltd. 2001;337-352.
8. Barnes P. Pathophysiology of allergic inflammation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Buse WW (eds). Allergy Vol11 5th ed. St. Lois Missori, Mosby Year Book Inc. 1998;356-365.
9. Ozalp I, Tuncer M. Asthma ve Allejik Hastalıklar Katkı Pediatri Dergisi 1997;18:6.
10. Buse WW, Hortwitz RJ, Reed CE. Asthma: definition and pathogenesis. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF,

Yunginger JW, Buse WW (eds). Allergy Volume II. 5th ed. St Lois, Missouri: Mosby-Year Book Inc, 1998:367-403.

11. Küçükusta AR, Müsellim B, Öngen G, et al. The prevalance of allergic diseases among scholl children living in air polluted and clean districts of İstanbul. Allergy 1996;51:31 (suppl)129.
12. Krämer U, Heinrich J, Wijst M, et al. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. Lancet 1998;352:450-454.
13. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, et al. Early expore to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: ağabeyrth cohort study with the West Midlands General Practise Research Database. J Allergy Clin Immunol 2002;109:43-50.
14. Annesi-Maesano I. Epidemiological evidence of the occurrence of rhinitis and sinusitis in asthmatics. Allergy 1999;54 (suupl.57):7-13.
15. Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. Perrennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in nonatopic subjects. J Allergy Clin Immunol 1999;104:301-304.
16. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. J Allergy Cln Immunol 2002;109:419-425.
17. Osborne CA, Coonor BJ, Lewis A, Gardner WN. Hyperventilation and asymptomatic chronic asthma. Thorax 2000;55:1016-1022.
18. Goodwin RD, Pine DS. Respiratory of disease and panic attacs among adults in the United States, Chest 2002;122:645-650.
19. Carr RE. Panic disorder and asthma. J Asthma. 1999;36(2):143-152.
20. Smoller JW, Otto MW. Panic, dyspnea, and asthma. Curr Opin Pulm Med 1998 Jan;4(1):40-45.
21. Field SK, Underwood M, Brant R, Cowie RL. Prevalance of gastroesophageal reflux symptoms in asthma. Chest 1996;109:316-322.
22. Sontag SJ, O'connel S, Khandelwal S, et al. Most asthmatics have gastroesophagea reflux with or without bronchodilator therapy. Gastroenterology 1990;99:613-620.
23. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. The prevalance of gastroesophageal reflux in asthma patients without reflux symptoms. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:34-39.

24. Hooloway JW, Jongepier H, Beghe B, et al. The genetics of asthma. In: Asthma, Chung F, Fabbri LM (eds). European Respiratory Monograph 2002;1003;23:25-26
25. Larj MJ, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. Immunol Allergy Clin N Am 2002;22:179-198.
26. Sandford AJ, Weir TD, Pare PD. Genetics of asthma in evidence based asthma management, FitzGareld JM, Ernst P, Boulet LP, O'Byne PM (eds). BC Decker Inc. Ontario 2001;13-26.
27. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, et al. A genome wide search for quantitative trait loci underlying asthma. Nature 1996;383:247-250.
28. Hizawa N, Freidhoff LR, Erlich E, et al. Genetic influences of chromosomes 5q31-q33 and 11q13 on specific IgE responsiveness to common inhaled allergens among African American families. JACI 1998;102:449-453.
29. Wijst M, Fischer G, Immervoll T, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. Genomics 1999;58:1-8.
30. Casolaro V, Steve NG, Zhimin S, et al. Biology and genetics of atopic disease. Current Opinion in Immunology 1996;8:796-803.
31. Cookson WOC. Asthma Genetics. Chest 2002;121 (3 Suppl):7-13.
32. Fowell, D.J. et al. Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in itk-deficient CD4+ cells. Immunity 11, 399-409 (1999).
33. Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G. & Tjian, R. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. Nature 397, 446-450 (1999).
34. McIntire, J.J. et al. (2001) Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. Nat. Immunol. 2, 1109-1116
35. Kuchroo, V.K. et al. (2003) The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. Nat. Rev. Immunol. 3, 454-462
36. Kaplan, G. et al. (1996) Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. EMBO J. 15, 4282-4296

37. Feigelstock, D. et al. (1998) The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* 72,6621-6628
38. Souza, A. J. et al. (2005) T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo- activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47:17113-8.
39. Shakhov, A. N. et al. SMUCKLER/TIM-4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signaling. *Eur. J. Immunol.* 34, 494-503 (2004).
40. Meyers, J. H. et al. (2005) TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1_TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat. Immunol.* 6, 455-464.
41. Kumanogoh, A. et al. (2002) Class IV semaphorin Sema4A enhances T cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419, 629-633
42. Money, L. et al. (2002) Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536-541
43. Chen Y, Langris CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein WM, Churakova T, Low J, Presta L et al.:Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2006, 116:1317-1326.
44. Sabatos, C.A. et al. (2003) Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4,1102-1110
45. Sanchez-Fueyo, A. et al. (2003) Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1093-1101
46. Matsumoto, R., Matsumoto, M. Seki, M. Hata, Y. Asano, S., Kanegasaki, R. L. Stevens, and M. Hirashima. (1998). Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273:16976.
47. Wada, J., and Y. S. Kawar. (1997). Identification and characterization of galectin-9, a novel β -galactoside-binding mammalian lectin. *J. Biol. Chem.* 272:6078.

48. Barondes, S. H., V. Castronovo, D. N. Cooper, R.D. Cummings, K. Drickame, T. Feizi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C, Hughes, K, Kasai, et al. (1994). Galectins: a family of animal β - galactoside binding lectins. *Cell* 76:597.
49. Barondes, S. H.,D. N. Cooper, M. A. Gitt, and H. Lefler. (1994). Galectins structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem* 269:20807.
50. Robertson. M. W., K. Albrandt, D. Keller, and F. T. Liu. (1990). Human IgE binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry* 29:8093.
51. Hadari, Y., K. Paz, R. Dekel, T. Mestrovic, D. Accih and Y. Zick. (1995). Galectin-8: a new rat lectin, related to galectin-4. *J. Biol. Chem.* 270:3447.
52. Robinovich, G. A. (1999). Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 6:711.
53. Liu, F. T. (2000). Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin. Immunol.* 97:79.
54. Hirashima, M. (1999). Ecalactin as a T cell derived eosinophil chemoattractant. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 120tSuppl.
55. Wada, J. K. Ota, A. Kuman, E. I. Wallner, and Y. S. Kanwar. (1997). Developmental regulation, expression and apoptotic potential of galectin-9, a β -galactoside binding lectin. *J. Clin. Invest.* 99:2452.
56. Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, et al. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer* 2002;99:809-16.
57. Kashio, Y.,et al. (2003) Galectin-9 induces apoptosis through the calcium- calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol.* 170, 3631-3636.
58. P.L. Schwartzberg, L.D. Finkelstein, J.A. Readinger, TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 284-295.
59. P.E. Graves, V. Siroux, Guerra, W.T. Klimecki, F.D. Martinez, Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5q33, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116 (2005) 650-656.

60. Zhu, H.G., et al. (2005) Expression of Tim-3 in tumor tissue and its role in the induction of tumor immune tolerance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 4,403-7
61. Ueda H, Howson JM, Esposito L. Et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-11.
62. Geng H., et al. Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 2006; 1411-20.
63. Frisancho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, Barrett MA, Gatewood SJL, Njoku DB, Cihakova D, Silbergeld EK, Rose NR, Fairweather D: Cutting Edge: T cell Ig Mucin-3 reduces inflammatory heart disease by increasing CTLA-4 during innate immunity. *J Immunol* 2006, 176:6411-6415.
64. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA: Dysregulated T cell expression of TIM-3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 2006, 203:1413-1418.
65. Khademi M., et al. T cell Ig- and mucin-domain containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004, 172:7169-7176.
66. Anderson, A.C., Anderson D.E. (2006) TIM-3 in autoimmunity. *C. O. Immunol.* 18:665-669.
67. Chae, S.C. et al. (2004) Molecular variations in Th1-specific cell surface gene Tim-3. *Exp. Mol. Med.* 36, 274-278
68. Chae, S.C. et al. (2004) The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* 95,91-95
69. Chae, S.C. et al. (2004) The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. *Hum. Immunol.* 65,1427-1431
70. Zhang C.C. et al. Study on relationship between polymorphism sites of TIM-3 and allergic asthma in a population of adult Hans from Hubei province of China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2006; 23(1):74-7.

ÖZGEÇMİŞ

12/10/1977 tarihinde Bursa'da doğdu. İlkokul eğitimini İhsan Dikmen 4 İlkokulu'nda; ortaokul ve lise eğitimlerini Ertuğrulgazi Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2004-2005 eğitim öğretim yılının bahar döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına bağlı İmmünoloji Yüksek Lisans Programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

EKLER

This document was created by Print2PDF

<http://www.software602.com>

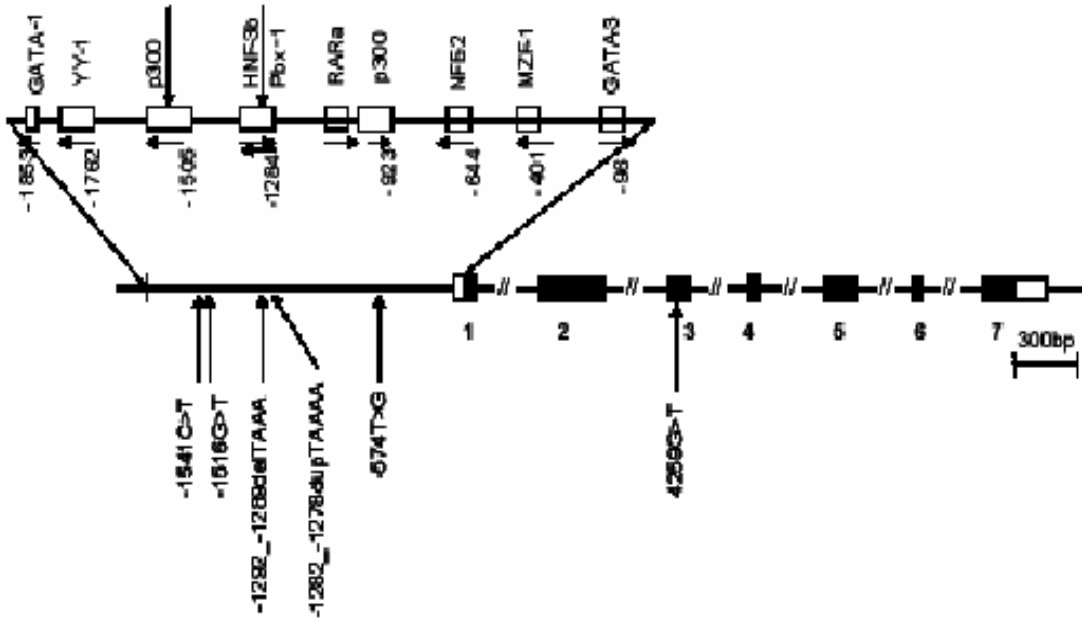
Th1 için spesifik yüzey molekülleri

NAME	DESCRIPTION / FUNCTION	MW (kDa)
CCR1, MIP-1 α -R, RANTES-R	Chemokine receptor for Th1. Binds to MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and MCP-3. Responsible for affecting stem cell proliferation.	63
CD4 (L3T4, W3/25)	Co-receptor in antigen-induced T-cell activation; thymic differentiation; regulation of T-B lymphocyte adhesion; primary receptor for HIV.	55
CD26 (DPP IV, THAM)	Costimulatory molecule in T cell activation; associated marker of auto-immune diseases, adenosine deaminase-deficiency and HIV pathogenesis.	110
CD94	Assembled with other C-type lectins (NKG2) forms inhibitory or activating receptors for HLA class I.	43
CD119 (IFN- γ R α)	IFN- γ regulates IL-18R α expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor β 2 expression.	35
CD183 (CXCR3)	Th1 cell surface marker. Cytokine that acts as a major participant in Th1-induced inflammation.	40
CD195 (CCR5, CCR5R1)	Regulates lymphocyte-chemotaxis activation and trans-endothelial migration during inflammation. Neutralizes HIV infection. Acts as a co receptor for HIV-1. Expressed on immature dendritic cells.	45
CD212 (IL-12RB2)	Th1 cell surface marker. The expression of this gene is up-regulated by IFN γ in Th1 cells, and plays a role in Th1 cell differentiation. The up-regulation of this gene is found to be associated with a number of infectious diseases, such as Crohn's disease and leprosy, which is thought to contribute to the inflammatory response and host defense.	97
GM-CSF	Pleiotropic cytokine that stimulates proliferation, maturation and function of hematopoietic cells. Produced by both Th1 and Th2 cells.	22
Granzyme B	Serine protease involved in the perforation of target cells and initiation of proteolysis that leads to apoptosis.	28
IFN- α	Antiviral and anti-proliferative activity.	19-26
IL-2 (TCGF)	IL-2 is the most potent T cell growth factor produced by Th1 cells.	15-17
IL-12	Inducer of proliferation and differentiation of Th1 cells. Dominant cytokine in Th1 development. Secreted by APCs, neutrophils and keratinocytes. IL-4 and IL-10 inhibit IL-12 production by dendritic cells and macrophages.	70
IL-15 (IL-1)	IL-15 is a recently discovered cytokine with the ability to stimulate the proliferation activity of Th1 and/or Th2 lymphocytes.	14-15
IL-18R	A co stimulatory factor for the induction of IL-12-mediated IFN γ production by Th1 cells, but also can induce IL-4 production and thus facilitate the differentiation of Th2 cells.	93, 160, 220
IL-23	IL-23 affects Th1 differentiation by directly stimulating proliferative responses of Th1 cells.	
IL-27	A member of the IL-12 family mainly produced by activated monocytes and dendritic cells. IL-27 induces expression of the IL-12 receptor that in turn allows the Th1 response to be maintained.	
IL-27R (TCR, WSX-1)	The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection.	
Lymphotoxin (LT- α)	Plays a role in the recruitment and activation of neutrophils and in lymphoid organogenesis. Being chemically similar to TNF, LT- α is also a mediator of acute inflammatory responses. LT- α is made by T lymphocytes.	60-70
Perforin	Cytolytic mediator produced by killer lymphocytes.	70
T-bet	Transcription factor for Th1. Regulates the differentiation and function of lymphocytes.	58
Tim-3 (Hawc12, Tim3, Q8WW60)	Th1-specific cell surface protein. Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease.	16
TNF- β	Secreted by Th1 and cytotoxic T lymphocyte (TC) cells. It targets tumor cells, macrophages and neutrophils. Exerts inflammatory and cytotoxic effects.	19
TRANCE	Expressed on the surface of activated CD4+ Th1 cells. The ligand for TRANCE is RANK. TRANCE increases expression of inflammatory cytokines, such as IL-1 and IL-6, and secretion of IL-12, which can promote differentiation of CD4+ T cells into Th1 cells.	42

Th2 için spesifik yüzey molekülleri

NAME	DESCRIPTION / FUNCTION	mw (kDa)
CCR3	Chemokine receptor for Th2. Binds to eotaxin, eotaxin-3, MCP-3, MCP-4, RANTES and MIP-1 δ . Alternative co-receptor with CD4 for HIV-1 infection.	41
CCR4	Chemokine receptor for Th2. High affinity for TARC/SCTYA17 and MDC/SCTYA22.	41
CCR7 (CD197, EBV1, Cmkhr7)	Th2 cell surface marker. Receptor for the MIP-3 β chemokine, probable mediator of EBV effects on B lymphocytes.	46-52
CCR8 (C ₉ , Cmkhr8)	CCR8 may contribute to the proper positioning of activated T cells within the antigenic challenge sites and specialized areas of lymphoid tissues. Th2 cell surface marker that plays a role in the control of Th2 responses, and may represent a potential target for treatment of allergic diseases.	41
CD4 (L3T4, W3/25)	Co-receptor in antigen-induced T-cell activation; thymic differentiation; regulation of T-B lymphocyte adhesion; primary receptor for HIV. Th2 cell surface marker.	55
CD30 (Bcl-2, Ki-1)	Member of TNFR family, involved in negative selection of T cells in thymus and TCR mediated cell death; expressed on R-S cells in Hodgkin's lymphomas. Th2 cell surface marker.	120
CD81 (TAPA-1)	Th2 cell surface marker. CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon bng team stimulation.	26
CD184 (CXCR4)	Homing receptor of hematopoietic progenitor cells; co-stimulation of B cells; induces apoptosis; involved with the entry of HIV-1. Cell surface marker for Th2 cells.	
CD278 (ICOS, H4, ALIUM, CRP-1)	ICOS co-stimulation leads to the induction of Th2 cytokines without augmentation of IL-2 production, suggesting a role for ICOS in Th2 cell differentiation and expansion.	40-70
c-maf	Transcription factor involved in the induction of production of IL-4.	
CRH2	Th2 cell surface marker. Putative G protein-coupled receptor. GPR44 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells).	43
GATA-3	Transcription factor associated with induction of Th2 cells.	49
GMA-CSF	Pleiotropic cytokine that stimulates proliferation, maturation and function of hematopoietic cells. Produced by both Th1 and Th2 cells.	22
IFN- γ R	Th2 cell surface marker.	60-65
IgD	IgD production by normal B cells is regulated positively by Th2 cytokines and negatively by Th1 cytokines.	
IL-1R	Th2 cell surface marker.	
IL-4 (BKDE, BKDF-1, BSF-1)	Th2 cytokine that stimulates antibody production by B cells. IL-4 stimulates Th2 activity and suppresses Th1 activity.	20
IL-5 (EDE, BCGFI1, TRF)	Th2 cytokine that stimulates antibody production by B cells. A potent factor that drives bone marrow progenitor cells into IL-4-producing eosinophils.	32-34
IL-6 (BCSF, BSF-2)	Th2 inducing cytokine.	21-28
IL-9	IL-9 is a pleiotropic cytokine that can induce Th2 cytokine expression. IL-9 is also a candidate gene for asthma and atrophy.	36
IL-10 (CSIF)	Th2 cytokine that inhibits IFN- γ , IL-2, and TNF- β . Inhibits IL-12 production by DCs thus inhibiting pre-Th cells from entering the Th1 pathway.	17-21
IL-12R β 1	Th2 cell surface marker.	
IL-13	IL-13 promotes the synthesis of IgE antibodies.	11-12
IL-15	IL-15 enhances a Th2 immune response.	14-15
ST2L/T1	ST2L is a stable cell surface marker that distinguishes Th2 from Th1 cells. It is also believed associated with Th2 cells function and is coexpressed with IL-4.	
Tim-1 (Hewc1, Timd1)	A novel allergy and asthma susceptibility gene expressed by Th2 but not Th1 cells.	

TIM-3 geni polimorfizm lokalizasyonları



TIM-3 -574 T>G polimorfizmi için çoğaltılan gen bölgesi**TIM-3**

GeneBank acc. No: NM_ 023133

1345801 tgttctgatg tctgtcctgt gatatcaaca aagaggaagc aatacttcag tggaagaaaa
1345861 cgctactcag tcatggcaca taaagagaac cctctaataa tgtctcagat gagatacacc
1345921 tgaaatggag catgtccgag tccatctgac tagcggggaa cacaaagtac agatgcatca
1345981 tccatggatt cattcactca aatcagtccc ttcatcaggc ctgtgaccaa agtttatgaa
1346041 gccctactt tgcaccaggc actggactag gaagtggaac acaacagtga atggcatgtt
1346101 ccttaccctc acatttacag accatagcaa ctcccagcat aagcctcact ctcatccttc
1346161 tttaacaca gattaggttg taccctataa ccttgctgag tctcagtttc ctcatctata

TIM-3 +4259 G>T polimorfizmi için çoğaltılan gen bölgesi**TIM-3**

GeneBank acc No:NM_ 032782

481 caaatcccag gcataatgaa tgatgaaaaa ttaacctga agttggcat caaaccagcc
541 *aaggtcacc* *ctgcaccgac* *tcg*gcagaga gacttactg cagccttcc aaggatgctt
601 accaccaggg gacatggccc agcagagaca cagacactgg ggagcctccc tgatataaat
661 ctaacacaaa tatccacatt ggccaatgag ttacgggact ctgattggc caatgactta
721 cgggactctg gagcaacat cagaataggg atctacatcg gagcagggat *ctgtgctggg*
781 *ctggctctgg* ctcttatctt cggcgcttta atttcaaat ggtattctca tagcaaagag

Beta- actin için çoğaltılan gen bölgesi**b-actin**

GeneBank acc. No:NM_ 001101

181 gcgccccagg caccagggcg tgatggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcga
241 cgaggcccag agcaagagag gcatcctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt
301 *caccaact*gg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt
361 ggctcccgag gagcaccocg tgctgctgac cgaggcccc ctgaacccca aggccaaccg
421 cgagaagatg acccagatca tgttgagac cttaacacc ccagccatgt acgttgctat
481 ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcacgtga tggactccgg