

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
AnaBilimDalı**

# **TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA GAMMA İNTERFERON PROMOTER POLİMORFİZMLERİ**

**Esmâ KONUK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2008**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
AnaBilimDalı**

# **TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA GAMMA İNTERFERON PROMOTER POLİMORFİZMLERİ**

**Esmâ KONUK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Olcay YEĞİN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir ( Proje No: 2006.02.0122.014)

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

**Antalya, 2008**

**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. .../06/2008

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Olcay YEĞİN**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD  
İmmünoloji Bilim Dalı

**Üye: Prof.Dr.Ender TERZİOĞLU**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları ABD  
İmmünoloji Bilim Dalı

**Üye: Prof.Dr.Salih ŞANLIOĞLU**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ABD

**Üye: Doç.Dr.Ayşen BİNGÖL BOZ**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD  
İmmünoloji Bilim Dalı

**Üye: Doç.Dr.Sadi KÖKSOY**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji ABD

**Onay:**

Bu Tez Enstitü Yönetimi Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Dünya nüfusunun 1/3' ü tüberküloz (TB) basili ile infektidir, Tüberküloz hastalığı bu bireylerin sadece % 5-10' unda gelişmektedir. Başta HIV olmak üzere bir çok infeksiyon, yaş, beslenme ve konağın bağışıklık yanıtını düzenleyen genetik faktörler hastalığa dönüşümü etkileyen önemli etmenlerdir. TB hastalığına yatkınlıkta “Purinergic Receptor” (P2X7), IFN $\gamma$  genlerindeki tek nükleotid değişimlerinin etkili olduğunu gösteren bir çok yayın vardır (1-4).

IFN- $\gamma$ , TB hastalığına dirençte en önemli sitokindir. İmmün sistemin fonksiyonun ve gelişiminin regülasyonunda önemli rol oynar. Çoğunlukla T hücreleri (CD4+ ve CD8+) ve Doğal killer hücreleri tarafından salgılanır. IFN- $\gamma$ , Th1 yönünde farklılaşmada önemlidir. IFN- $\gamma$  'nın mikobakteri enfeksiyonlarını sınırlamada önemli olduğunu gösteren yayınlar var (4,26).

Daha önce birimizde Tüberkülozlu hastalarda gamma interferon + 874T/A polimorfizmi ' ne yönelik yapılan çalışmada, interferon gamma +874 bölgesinde TT olmanın tüberküloza dirençle ilişkili olduğu bulunmuş ve bu bölgedeki polimorfizmin interferon yanıt düzeyini etkilediği gözlenmiştir. Bu gözlem TB hastalığına yatkınlıkla ilgili bu gen içinde başka bölgelerin veya başka genlerdeki değişikliklerin de yatkınlık veya dirençle ilgili olabileceğini düşündürmektedir (6)

Yukarıda özetlediğimiz polimorfizm dışında İnterferon gamma geni promoter bölgesinde -155 A/G ve -183 G/T polimorfizmlerinin işlevsel önemi olduğunu düşündüren çalışma yayınlanmıştır (4)

Bu projede biz TB hastalığına dirençte interferon gamma geni -155A/G ve -183G/T polimorfizmlerinin ilişkisini bir olgu - kontrol araştırması ile incelemeyi planladık. Ve çalışmalarımız sonucunda Türk toplumunda bu polimorfizme rastlamadık.

Yapılan bir çok çalışmada P2X7 reseptörü SNP' lerinin TB' ye genetik yatkınlıkla ilgili olduğu gösteriliyor (7) (3). Bizde IFN- $\gamma$  promoter polimorfizmleriyle ilgili yaptığımız araştırmaların ardından P2X7 ile TB' ye yatkınlık arasında Türk toplumunda bir yatkınlık olup olmadığını araştırdık. Çalışmamızın sonucu P2X7 genindeki Glu496Ala değişimine sebep olan A1513C polimorfizmi Akciğer TB li hastalarda ve sağlıklı kontrollerde gösterildi fakat sağlıklı kontrollerdeki sonuçlarla TB hastalarının sonuçları birbirine çok yakın olduğu için Tüberküloz hastalığına yatkınlıkta bu polimorfimin rolü olduğunu söyleyemeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Tüberküloz, İnterferon Gamma, P2X7, Polimorfizm

## ABSTRACT

About 1/3 population of the world is infected with tuberculosis basillus, TB, but the TB disease develops only in %5-10 of the infected. Various infections such as HIV, the age and diet of the host, and the genetic factors that regulate the host's immune response are important factors in developing the disease. There are many studies demonstrating that a single nucleotide polymorphisms in "Purinergic Receptor" (P2X7), IFN $\gamma$  promoter genes affects susceptibility to TB disease (1-4).

IFN-gamma is the most important cytokine in resistance to TB disease. It plays crucial roles in the regulation of the development and function of the immune system. It is mostly secreted by the T cells (CD4+ and CD8+) and NK cells. IFN-gamma is important for the transformation towards Th1. There are studies showing that IFN- $\gamma$  is important in limiting mycobacterial infections (4-26).

In a study of ours regarding gamma interferon + 874T/A polymorphisms in TB patients, the presence of TT in the interferon gamma +874 region was found to be related with TB resistance and the polymorphism in this region was associated with interferon response levels. This observation led us to think that other regions in this particular gene or other polymorphisms in other genes might be related to susceptibility or resistance to TB disease (6).

Other than the polymorphism we have described above, there are studies suggesting that the -155 A/G and -183 G/T polymorphisms in the interferon gamma gene promoter region might have functional importance (4).

In this study, we aimed to investigate the relation of -155A/G and -183G/T polymorphisms in the interferon gamma gene with resistance to TB in a case- control study. After all our studies, we have found no this polymorphism in Turkish people

Many studies have shown that P2X7 receptor single nucleotide polymorphisms (SNP) are associated with genetic predisposition to TB disease (3, 7). After the investigation we have made on the IFN- $\gamma$  promoter polymorphism, we also have investigated whether there is a relationship between P2X7 and susceptibility to TB in the Turkish population. As a result of our study, we have demonstrated the presence of the A1513C polymorphism that causes a change in the Glu496Ala in P2X7 gene in the TB patients and healthy controls, but since the control group results were found to be similar with TB patient, we can not conclude that this polymorphism is directly related to susceptibility to TB.

**Key Words:** Tuberculosis, Interferon Gamma, P2X7, Polymorphisms

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde yol gsteren ve her zaman desteğini hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Olcay YEğİN'ne, tezimde takıldığımız yerlerde yardımını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Uğur YAVUZER'e, bana her aşamada yardımcı olan ve beni hiç yalnız bırakmayan Uzman Biyolog Nilgün SALLAKÇI' ya, bilgilerini benimle paylaşarak destek olan Dr. Nilüfer İMİR' e, teknik olanakları ile bu çalışmanın Tüm basamaklarının gerçekleşmesinde desteği olan olmayan bütün Merkez Araştırma Laboratuvarı ve İmmünoloji Bilim Dalı çalışanlarına, istatistikte yardımını esirgemeyen Araç. Gör. Özgür TOSUN' a, manevi desteklerinden dolayı Tüm aileme, en bunaldığım anlarda gülücükleri ile bana moral veren biricik oğlum Egeciğime teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|   | Sayfa |
|---|-------|
| <b>ÖZET</b>   | iv    |
| <b>ABSTRACT</b>   | v     |
| <b>TEŞEKKÜR</b>   | vi    |
| <b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>   | vii   |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>                             | ix    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>  | x     |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>  | xi    |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>  | xii   |
| <b>GİRİŞ</b>  | 1     |
| <b>GENEL BİLGİLER</b>   | 3     |
| 2.1. Tüberküloz   | 3     |
| 2.1.1. Tüberkülozun tarihçesi ve Epidemiyolojisi                  | 3     |
| 2.1.2. Mikobakterinin morfolojisi ve yapısı                       | 4     |
| 2.1.3. Tüberküloz patogenezi ve immünolojisi                      | 5     |
| 2.2. İnsan Genetiği ve Tüberküloza Yatkınlık                      | 12    |
| 2.3. İnterferon Gamma   | 13    |
| 2.4. Pürinerjik Reseptörler                                       | 15    |
| <b>BİREYLER VE YÖNTEMLER</b>                                      | 18    |
| 3.1. Olgular  | 18    |
| 3.2. DNA İzolasyonu   | 18    |
| 3.3. IFN Gamma promoter için PCR                                  | 19    |
| 3.3.1. IFN Gamma promoter amplifikasyonu                          | 19    |
| 3.3.2. IFN Gamma promoteri için fenol kloroform ekstraksiyonu     | 20    |
| 3.3.3. IFN Gamma -155 ve -183 için kesim reaksiyonları            | 21    |
| 3.3.3.1. IFN Gamma -155 A/G için kesim reaksiyonu                 | 21    |
| 3.3.3.2. IFN Gamma -183 G/T için kesim reaksiyonu                 | 21    |
| 3.4. P2X7 için PCR  | 22    |
| 3.4.1 P2X7 amplifikasyonu   | 22    |
| 3.4.2. P2X7 için fenol kloroform ekstraksiyonu                    | 23    |
| 3.4.3. P2X7 A1513C için kesim reaksiyonu                          | 23    |
| <b>BULGULAR</b>   | 25    |
| 4.1.İnterferon Gamma -155 A/G Polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları  | 25    |
| 4.2. İnterferon Gamma -183 A-T Polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları | 26    |
| 4.3. P2X7 A1513C polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları               | 28    |
| <b>TARTIŞMA</b>   | 31    |

|                  |           |
|------------------|-----------|
| <b>SONUÇLAR</b>  | <b>35</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b> | <b>36</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>  | <b>48</b> |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>ARB</b>                       | : Aside dirençli bakteri                             |
| <b>ATP</b>                       | : Adenozin Tri Phosphate                             |
| <b>BCG</b>                       | : Bacillus Calmette-Guérin                           |
| <b>CD</b>                        | : Cluster of differentiation                         |
| <b>CFP</b>                       | : Culture filtrate protein                           |
| <b>CTL</b>                       | : Sitotoksik T Lenfosit                              |
| <b>DC-SİNG</b>                   | : Dendritic Cell-Specific ICAM-grabbing Non-integrin |
| <b>DNA</b>                       | : DeoksiriboNükleik Asit                             |
| <b>ER</b>                        | : Endoplasmik retikulum                              |
| <b>HIV</b>                       | : Human İmmündeficiency virus                        |
| <b>IFN</b>                       | : İnterferon   |
| <b>IFN-gR</b>                    | : İnterferon gamma reseptör                          |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>   | : İnterferon gamma                                   |
| <b>Ig</b>                        | : İmmünglobulin                                      |
| <b>IL</b>                        | : İnterlökin   |
| <b>LAM</b>                       | : Lipoarabinomannan                                  |
| <b>MHC</b>                       | : Major Histocompatibility Complex                   |
| <b>MSMD</b>                      | : Mycobacterial hastalığa mendeliyan yatkınlık       |
| <b>MTB</b>                       | : Mikobakterium Tuberculosis                         |
| <b>P2X7</b>                      | : Pürinerjik reseptör                                |
| <b>P2Y</b>                       | : Metabotropik nükleotid reseptörler                 |
| <b>PCR</b>                       | : Polimeraz zincir reaksiyonu                        |
| <b>PPD</b>                       | : Purified protein derivated                         |
| <b>SNP</b>                       | : Single Nükleotid Polimorphism                      |
| <b>STAT</b>                      | : Signal transducer and activator of transcription   |
| <b>TB</b>                        | : Tüberküloz   |
| <b>TDT</b>                       | : Tüberkülin deri testi                              |
| <b>Th1</b>                       | : T Helper 1   |
| <b>Th2</b>                       | : T Helper 2   |
| <b>TLR</b>                       | : Toll-Like Receptor                                 |
| <b>TNF</b>                       | : Tümör nekroz faktör                                |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>    | : Tümör nekroz faktör alfa                           |
| <b>WHO</b>                       | : Dünya Sağlık Organizasyonu                         |
| <b><math>\gamma\delta</math></b> | : Gamma Delta  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil  | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2. 1 TB morfolojisi  | 4     |
| Şekil 2. 2 Mikobakterinin hücre duvarı: 1-dış lipit, 2-mycolic acid, 3-polysaccharides (arabinogalactan), 4-peptidoglycan, 5-plasma zarı 6-lipoarabinomannan (LAM), 7-phosphatidylinositol mannoside, 8-hücre duvar iskeleti | 5     |
| Şekil 2. 3 Bir makrofajın Tüberküloz patojenini yutması  | 8     |
| Şekil 2. 4 TB bulaşımı   | 9     |
| Şekil 2. 5 TB' a karşı koruyucu immünitede T hücre populasyonları ve antijenler  | 10    |
| Şekil 2. 6 TB patogenezi   | 11    |
| Şekil 2. 7 TB persistansı  | 11    |
| Şekil 4.1. Tüberkülozlu hastalarda İnterferon gamma -155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu   | 25    |
| Şekil 4.2. Sağlıklı kontrollerde İnterferon gamma -155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu   | 25    |
| Şekil 4.3. Tüberkülozlu hastalarda İnterferon gamma -183 A/Tpolimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu hasta  | 27    |
| Şekil 4.4. Sağlıklı kontrollerde İnterferon gamma -183 A/T polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu kontrol   | 27    |
| Şekil 4.5. Tüberkülozlu hastalarda P2X7 A1513C polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu   | 29    |
| Şekil 4.6. Sağlıklı kontrollerde P2X7 A1513C polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu   | 29    |

## TABLULAR DİZİNİ

| <b>Tablo</b>   | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| <b>Tablo 3.1.</b> İnterferon gamma promoterindeki SNPLer,<br>Kullanılan primerler, annealin ısısı, amplifikasyon ürününün boyu | <b>19</b>    |
| <b>Tablo 3.2.</b> İnterferon gamma promoterindeki SNPLer için kurulan<br>PCR da kullanılan malzemeler ve miktarları            | <b>20</b>    |
| <b>Tablo 3.3.</b> İnterferon gamma promoterindeki SNPLer, kesim enzimleri<br>ve amplifikasyon ürünlerinin boyları              | <b>21</b>    |
| <b>Tablo 3.4.</b> İnterferon gamma -155A/G değişimi için kesim reaksiyonu<br>koşulları   | <b>21</b>    |
| <b>Tablo 3.5.</b> İnterferon gamma -183G/T değişimi için kesim reaksiyonu koşulları  | <b>21</b>    |
| <b>Tablo 3.6.</b> İnterferon gamma promoterindeki SNPLer, primerler, annealig ısısı<br>ve amplifikasyon ürününün boyu          | <b>22</b>    |
| <b>Tablo 3.7.</b> P2X7 RFLP-PCR amplifikasyonu için kullanılan<br>malzemeler ve miktarları                                     | <b>23</b>    |
| <b>Tablo 3.8.</b> P2X7 SNP' i, kesim enzimleri ve amplifikasyon ürünlerinin<br>boyları   | <b>23</b>    |
| <b>Tablo 3.9.</b> P2X7 kesim reaksiyonu koşulları  | <b>24</b>    |
| <b>Tablo 4.1.</b> İnterferon Gamma -155 A/G ye göre genotiplendirme yapılan<br>hasta ve kontrollerin dağılımı                  | <b>26</b>    |
| <b>Tablo 4.2.</b> İnterferon gamma – 155 A/G polimorfizmi açısından<br>yaptığımız çalışmanın Hardy-Weinberg dengesi            | <b>26</b>    |
| <b>Tablo 4.3.</b> İnterferon Gamma -183 A/T ye göre genotiplendirme<br>yapılan hasta ve kontrollerin dağılımı                  | <b>28</b>    |
| <b>Tablo 4.4.</b> İnterferon gamma – 183 G/T polimorfizmi açısından<br>yaptığımız çalışmanın Hardy-Weinberg dengesi            | <b>28</b>    |
| <b>Tablo 4.5.</b> P2X7 A1513C ye göre genotiplendirme yapılan hasta ve<br>kontrollerin dağılımı                                | <b>29</b>    |
| <b>Tablo 4.6.</b> P2X7 A1513C polimorfizmi açısından yaptığımız<br>çalışmanın Hardy-Weinberg dengesi                           | <b>30</b>    |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| Çizelge   | Sayfa |
|---|-------|
| Çizelge 4.1. . İnterferon gamma – 155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı | 26    |
| Çizelge 4.2. İnterferon gamma – 183 G/T polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı   | 28    |
| Çizelge 4.3. P2X7 A1513C polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı                  | 30    |

## GİRİŞ

Tüberküloz 120 yıldan beri etkeni bilinmesine, 61 yıldır tedavi edilebilmesine ve korunulabilir bir hastalık olmasına rağmen hem gelişmiş hem gelişmekte olan ülkelerde yüksek morbidite ve mortalite bakımından önemini sürdüren bir hastalıktır (8). Dünya nüfusunun 1/3'ü tüberküloz basili ile enfektidir. Yılda 62 milyon kişi mikrobunu almakta ve 8–10 milyon kişi de hastalanmaktadır (1, 9). Ülkemizde de her yıl 35–40 bin kişinin tüberküloza yakalandığı tahmin edilmektedir. Ancak Sağlık Bakanlığı tarafından bu hastaların sadece 17 bini saptanabilmekte, saptanabilen hastaların da ancak 6 bini tedavi edilebilmektedir. Tüberküloz dünyada ölüme neden olan ilk on hastalıktan biridir (9).

Tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalar bazı hastalarda Tüberküloza karşı genetik yatkınlık olduğunu düşündürmektedir. Topluma dayalı çalışmalar Tüberküloz ile bazı HLA-allel'leri arasında ilişki bulmuştur. Aynı zamanda vitamin D reseptörü, interlökin 1 ve doğal dirençle ilgili makrofaj proteini (NRAMP1) için olan genlerde polimorfizm saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi henüz bilinmemesine rağmen NRAMP1 polimorfizmi interlökin-10 regülasyonu ile birlikte Tüberküloza eğilimi etkiliyor olabilir. Genetik polimorfizm ve Tüberküloz duyarlılığı arasındaki ilişki etnik orijine göre değişebilir, ancak küresel Tüberküloz yüküne ne kadar katkıda bulunduğu net değildir, çünkü ömür boyu karşılaşılan çevresel etkilerle genetik yatkınlığı ayırmak çok güçtür (10).

*M.Tuberculosis* ile infeksiyon sonrasında kişiler arasındaki farklılıklar değişik doğal direnç mekanizmalarının etkinliğiyle kısmen açıklanabilir. Fagositoz, immün tanıma, sitokin oluşumu ve efektör mekanizmaların hepsi doğal direnç katkı sağlar. Bu noktada, farklı gen polimorfizminin Tüberküloz duyarlılığı ve ciddiyetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizmin bazıları fonksiyoneldir; ama çoğunun fonksiyonel (immünolojik) değişiklikleri henüz gösterilmemiştir ki bu konularda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (11).

Patojen vücuda girdikten sonra makrofajlar aktive edilir ve proinflatuar sitokinler sekrete edilir, inflamasyon oluşur ve immün hücreler çağırılır ve sonuç olarak fagositler mikrobunu yok eder ve toksik metabolitler salınır. IFN- $\gamma$  (Orijinal adlandırması Makrofaj aktive edici faktör) aralarında en önemlisidir. IFN- $\gamma$  ile makrofajların uyarımı direkt olarak antimikrobiyal ve antitümör mekanizmalarını uyarır. IFN- $\gamma$  lökositlerin çağırılmasını yönetir ve birçok hücre tipine farklılaşmayı, olgunlaşmayı ve büyümeyi yönetir(113–115). İlavenen, NK hücre aktivitesini artırır (116) ve sınıf değişimi ve immünglobulin üretimi gibi B hücre fonksiyonlarını düzenler(115–117). IFN- $\gamma$  Tüberküloza karşı bağışıklıkta önemlidir. IFN- $\gamma$  sitokininin reseptörlerindeki defektlerin Tüberküloza yatkınlığın arttığı biliniyor (4,69).

Pürinerjik reseptörler yüksek derecede makrofajlarda ekspresse olurlar ve ATP uyarımı ile mikobakterinin ölümüne aracı olurlar (12). TB yatkınlığı ile P2X7 SNP'lerin arasında ilişki bulundu. (7). A1513C SNP 'nın son bir çalışmasında pulmoner TB değil fakat Extrapulmoner TB ile ilişkisi gösterildi (3).

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tüberküloz

#### 2.1.1. Tüberkülozun tarihçesi ve Epidemiyolojisi

Tüberküloz, tanımlanmış en eski hastalıklardan biridir (13). Eski mısır mumyaları üzerinde bulunan lezyonlardan alınan doku parçalarında PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile Mycobacterium'a ait DNA parçaları gösterilmiştir.(14, 15) Robert Koch, Tüberküloz basilini 125 yıl önce 24 Mart'da keşfetmiştir. Bu nedenle 24 Mart her yıl kutlanmak üzere ' Dünya Tüberküloz Günü' ilan edilmiştir (16).

Tüberküloz, dünya çapında en yaygın bulaşıcı hastalıkların birisidir (17). Tüm organlarda görülebilen Tüberküloz hastalığında, en sık tutulan organ %85 oranı ile akciğerlerdir. Etkeni, patogenezi ve tedavi yolları çok iyi bilinmesine rağmen hastalık çok sayıda genç erişkinde yol açtığı ölümlerle dünyada önemini sürdürmektedir(18).

Gelişmekte olan ülkelerde, Tüberküloz, yüksek hastalık ve ölümlülük oranlarını gösterir. Hastalık, HIV ile infekte hastalar gibi immün sistemi baskılanmış kişiler arasında özellikle batılı ülkelerinde artış gösteriyor (17, 19, 20). 2000 yılında her 100 000 kişiden 5,8' inde görülme sıklığı ile U.S. de 16 377 Tüberküloz vakası vardı. Görülme sıklığı durmadan azalıyordu. 1993'de her 100000 kişiden 10,5'inde görülme sıklığı ile 26673 Tüberküloz vakası zirve yapmıştı. Bu artış, antiretroviral tedaviden önceki periyotta HIV ile infekte bireylere büyük ölçüde bağlıydı (19–21). Diğer taraftan 1997' de Tüberkülozun dünya çapındaki görülme sıklığının 8000000 olduğu ve bunların 2000000'nun öldüğü tahmin ediliyor. Vakaların çoğu gelişmekte olan ülkelerdeydi (19).

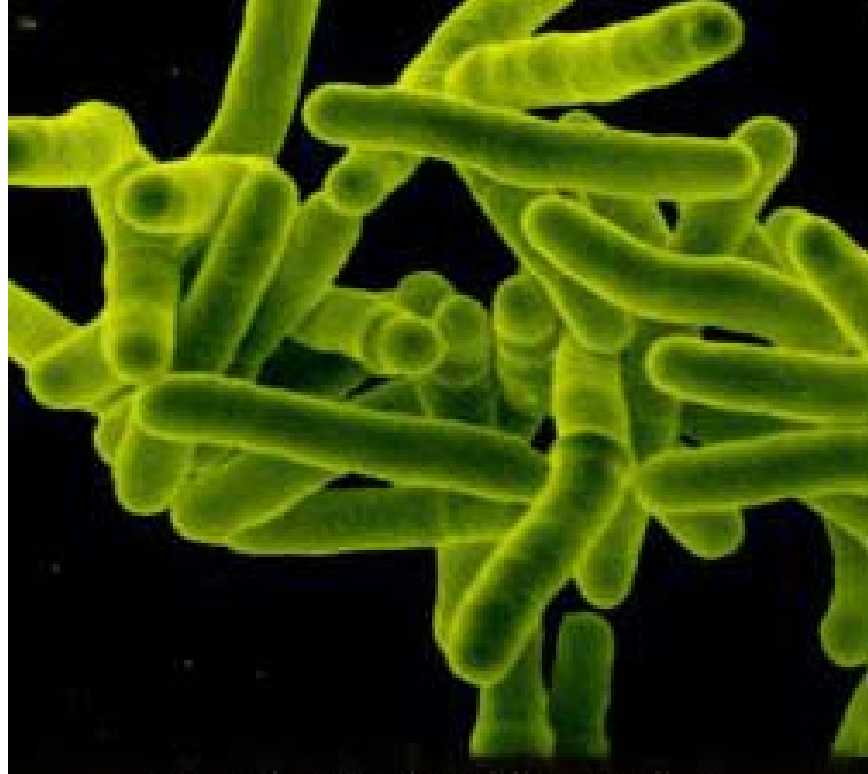
Dünya sağlık organizasyonu, dünya çapında Tüberkülozun görülme yaygınlığının 2005 de 14 milyonu aştığını ve bu kişilerin 1,5 milyondan fazlasında hastalıktan öldüğü tahmin ediyor (22). Dünya sağlık organizasyonu (WHO) neredeyse dünyanın üçte birinin Tüberküloz basili( Şekil 2.1) ile infekte olduğunu ve bu bireylerin %5–10' nun yaşamları esnasında aktif TB gelişmiş olduğunu tahmin ediyor (23).

Ülkemizde TB'nin durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile kötü programlar uygulanmış ülkeler arasında bir konumumuz olduğu görülmektedir. Hastalık insidansı Hindistan, Bangladeş, Çin gibi ülkelerde yüz binde yüzün üzerinde, hatta yüzbinde ikiyüzün üzerindedir. Ülkemizdeki TB hastalık insidansı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüzbinde 27'dir (24).

TB gelişimini; yaş, alkol, yetersiz beslenme ve HIV gibi birçok faktörler etkileyebilir. Belli monozigotik ve dizigotik ikililerdeki farklı uyum oranları ve farklı ırksal farklılıklardan kaynaklanan konak genetik faktörleri *M.tuberculosis*' e yatkınlıkta önemli belirleyicilerdir. Özellikle konağın bağışıklık yanıtını düzenleyen genetik faktörler *M.Tuberculosis*' e yatkınlıkta önemli önemli rol oynarlar (2, 25).

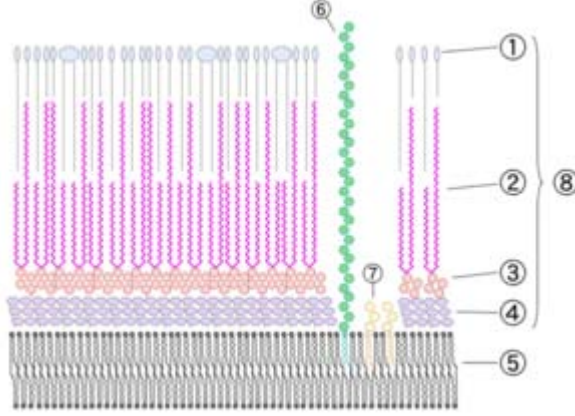
### 2.1.2. Mikobakterinin morfolojisi ve yapısı

Tüberküloz' a *M. Tuberculosis* sebep olur. Spor formunda olmayan, hareketsiz zorunlu aerobik bir bakteridir (26). Bu nedenle oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda yerleşmeye eğilimlidir ve akciğerlerde de oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu apikal bölgede daha sık tutulum vardır (27). *Mycobacterium*' un hücre duvarı mycolic acids gibi uzun zincirli birkaç kompleks lipidleri içerir (Şekil 2.2) (26). Bu özelliğinden dolayı da karbolfüksin ile boyandıktan sonra asid ve alkolle deklorize edilemez. Bu özellik aside dirençli bakteri (ARB) tanımını ortaya çıkarmıştır (27). Hücre duvarı elemanları tüm Freund' in adjuvanı içinde kullanıldı ve bu adjuvan deney hayvanlarında antijene bağışık yanıtı arttırmak için kullanıldı. Organizma, hücre duvarında hiç eksotoksin üretmez ve hiç endotoksin içermez (26).



Şekil 2.1. TB morfolojisi (28).





**Şekil 2.2.** Mikobakterinin hücre duvarı: 1 -dış lipit, 2- mikolik acid, 3- polisakkaritler (arabinogalactan), 4- peptidoglikan, 5- plasma zarı, 6- lipoarabinomannan (LAM), 7- fosfatidil inositol mannozid, 8- hücre duvar iskeleti (29).

### 2.1.3. Tüberküloz patogenezi ve immünolojisi

İnsanlar bu bakteri için doğal bir rezervuardır. Akciğerde gizlenmiş olan hastalık etkeni hava yolu solunumu ile kişiden kişiye aktarılır. Organizma sistemik ve kronik bir hastalığa sebep olur. Vücuttaki organ ya da dokulara penetre olur (21, 30–34). En bulaşıcı olanları, balgam mikroskopisinde “aside dirençli bakteri” (ARB) pozitif olan akciğer ve larinks TB’u olanlardır. Yayma negatif TB’ lu hastaların bulaşıcılığı çok daha azdır (35). Hasta ile yakın vade uzun süreli teması olan kişilere karşı bulaşma ihtimali daha fazladır. Bu kişiler bazen aynı iş yerini ya da aynı evi paylaşmış olan arkadaşlar, çoğunluklarda aile içi bireyler olabilir. Bazı şuşların daha bulaşıcı olduğu gösterilmiştir (36).

Bakterinin temizlenmesinde özellikle makrofajlar ve makrofaj fonksiyonu üzerine etkili olan sitokinlerin önemli rolü vardır (37). Akciğer TB’unda dört evre vardır. Birinci evrede; Alveollere gelen *M. Tuberculosis*’i öldürmek için ilk savunma makrofajlardan gelir( Şekil 2.3). Basilin öldürülmesinde, konağın mikrobiyal fagositer kapasitesi, alınan basilin sayısı ve virulans faktörü önemlidir. Organizma, makrofaj tarafından öldürülmekten kaçış eğilimindedir ve fagosomlar gibi vakuoller içinde yaşamını sürdürür. Bu vakuoller, lizozomal enzimler ile birleşmeden kaçınır ve kaçınarak degridasyonu önler. Ve basil kaçmayı başarinca çoğalmaya başlar. İkinci evrede; Konak, infeksiyonu kontrol için gerekli olan inflamatuvar cevap ile *M Tuberculosis*’ e tepki gösterir. İlk önce kandaki monosit ve inflamatuvar hücreler akciğere gelirler. Monositler dokuya ulaşması ile makrofajlara dönüşüp basili fagosite etmeye başlar ancak yok edemezler. Aritmetik olarak çoğalmaya başlayan basilin etrafında makrofaj kümelenmesi olur doku hasarı çok değildir. İki hafta sonra T hücre yanıtı gelişir böylelikle hücre içinde bulunan basili öldürmek için makrofajlar aktive olur. Fakat bu aynı zamanda geniş bir doku zararına sebep olabilir. Ve üçüncü evrede; basilin logaritmik giden artışı durdurulmuş olur. Primer lezyondaki santral solid merkez ile hücrenin dışındaki büyüme inhibe olur. Dördüncü evrede; bağışıklığın

zayıfladığı anlarda birincil infeksiyondan yıllar sonra olsa bile hastalık kan yolu ile yayılıp tekrardan oluşabilir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.6) (11).

Tüberküloz patogeneğinde 4 evre

Evre 1- Başlangıç

Evre 2- Logaritmik çoğalma ve Simbiyoz → PRİMER ENFEKSİYON

Evre 3- İmmunojenik kontrol

Evre 4- Erime ve kazeifikasyon 1 → progresif primer tüberküloz

2 → post primer tüberküloz  
SEKONDER ENFEKSİYON

↑ ↑  
Endojen kaynak eksojen kaynak  
(reaktivasyon) (reenfeksiyon)

İmmün komponentlerin geniş bir sınıfı *M.Tuberculosis*' in büyümesini sınırlandıran etkili bir cevap içerirler. İmmün cevabın en önemli komponentleri makrofajları, T hücrelerini (CD4+ ve CD8+) ve IFN $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  ve IL-6 içeren sitokinlerdir. Makrofajlar *M. Tuberculosis*' in kontrolünde önemli bir rol oynar. Ancak, mikroorganizma dinlenen makrofajlar içinde çoğalma yeteneği varken, aktif makrofajlar tarafından ortadan kaldırılabılır. Diğer yandan *M.Tuberculosis*, Makrofajların apoptosisine sebep olabilir ve bu yakın doku hasarında önemli rol oynayabilir (38) MTb'nin salgıladığı ESAT-6:CFP-10 kompleks, ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin makrofaj sinyal yolunda ayarlamalar yaptığına bunuda bir mekanizmayı tanıyarak makrofajlar içinde MTb' in yaşaması için uygun ortam oluşmasına yardım ederek yaptığına ve MTb patogeneğinde katkıda bulunuyor olabileceğine yönelik yayınlar var( Şekil 2.7) (39)

Ayrıca TNF- $\alpha$  üretemeyen veya cevap veremeyen fareler bakteri yayılmasını sınırlamak için granuloma oluşturamazlar (40).

Genetik veya ırksal faktörler, *M.tuberculosis*'i elimine etmede önemli rol oynayabilir (41). Ayrıca Genetik yatkınlık Tüberkülozun yayılmasında rol oynayabilir (26). T hücreler, M. Tuberculosis' a karşı savunmada majör bir rol oynar. CD4+ ve CD8+ T hücreleri infekte hücreler için sitotoksik olabilir. CD4+ T hücreler immün cevapta önemli rol oynayabilir. Ve buda bize CD4+ T hücreleri azaldığı zaman HIV ile infekte bireylerde Tüberküloza yatkınlığın belirgin artışı açıklar. Th2 cevabı infeksiyonu içeren ve aktif hastalık geliştirmeyen hastalarda üstünken, Th1 hücre cevabı Tüberküloz' un kontrolü ve korunma ile ilişkili üstünlük sağlar. Th1 cevabı HIV li bireylerde özellikle CD4+ T hücre sayımı düşük olanlarda belirgin olarak hasar görmüştür (26). CD8+ T lenfositleride muhtemelen hücreleri lizis ederek ve sitokin salınımı yaparak katkıda bulunurlar (11).

T lenfositlerin fonksiyonel çeşitliliği TB hastalığına duyarlılık ve hastalığın sonuçları arasındaki farklılıkla ilişkili olabilir. Koruyuculuk Mikobakteriyel infeksiyonlarda Th1 yanıtı için esastır. IFN $\gamma$  reseptörü olmayan bireylerde tekrarlayan mikobakteri infeksiyonları hatta bundan dolayı da ölümler görülmüştür. TB hastalarında Th2 tipi sitokinler de artış olduğu saptanmış ve Th2 tipi sitokinler IFN $\gamma$  uyarımını invitro olarak inhibe edip konak cevabını azaltabilir (11).

Mikobakteriye ait antijenin sunumunun ardından sitokin salınımı ve kazanılmış T lenfosit aracılı bağışıklığın devreye girmesi ve bu bağışıklığın devam etmesinde Fagositik hücreler oldukça büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca, fagositik hücrelerin doğal savunma mekanizması da önemlidir. Yapılan bir deneyde mikobakterilere hassas olan tavşanlar dirençli tavşanlara göre inhalasyondan 7 gün sonra akciğerlerinde 20–30 kat daha fazla canlı basile sahiptiler. Nitekim aşılansız farelerde yapılan çalışmalarda kazanılmış T hücre bağışıklığının dissemine Tüberkülozdan onları koruduğunu, ama başlangıç akciğer infeksiyonunu önleyemediğini göstermiştir. Dissemine hastalığa karşı BCG ile kazanılmış T lenfosit aracılı bağışıklık daha koruyucudur. Doğal olarak kazanılmış T lenfosit bağışıklığı eksojen olarak akciğerin yeniden infekte olmasına karşı koruyucu değildir. Bu bilgiler ışığında konağın savunma mekanizmalarının T lenfositlerinden bağımsız haliyle akciğer infeksiyonundan korunmada oldukça önemli olduğunu gösteriyor. Birçok farklı epidemiyolojik veri gösteriyor ki Tüberkülozda doğal direnç önemlidir(11).

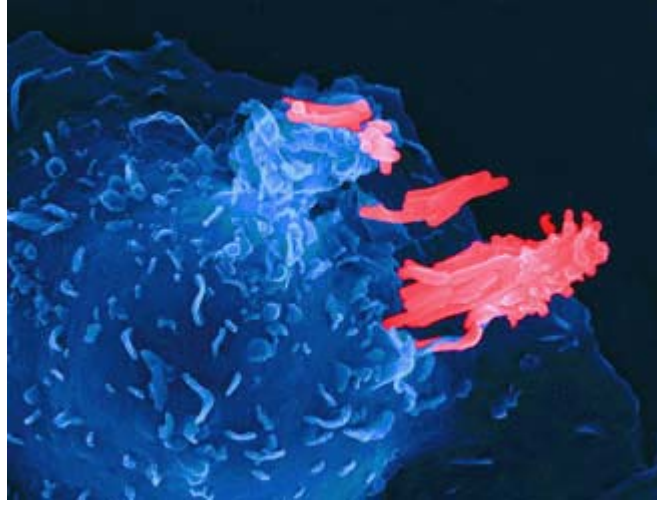
Kanıtlar gösteriyor ki farklı T hücre popülasyonları TB' a karşı koruyucu immüniteye katılırlar. *M. tuberculosis* geç enedozom-lizozom evresinde fagozomlarda yerleşir. Buradan, onun antijenlerinin hücre yüzeyine MHC Sınıf II antijenleri tarafından taşınırlar ve CD4+ hücrelerini uyarırlar. Bazı protein antijenleri MHC Sınıf I molekülleri tarafından sunulur ve CD8+ T hücrelerini uyarırlar. Glikolipit antijenler CD8+ T hücreleri veya çift negatif (ÇN) için Grup 1 CD1 molekülleri (CD1a, b or c) tarafından sunulurlar. Sonuç olarak fosfat içeren küçük moleküller bilinen sunum moleküllerinin yokluğunda  $\gamma\delta$  T hücreleri tarafından sunulurlar. Tüm T hücre popülasyonlarının çeşitli derecelerde sitotoksik T lenfosit (CTL) aktivitesini ekspresse ettiği ve IFN- $\gamma$  salgıladığı gösterildi (Şekil 2.5) (47).

Diğer önemli sitokin IL-12 *M.Tuberculosis*'in kontrolünde önemli rol oynar. IL-12 aktive makrofajlar tarafından üretilir ve Th1 cevabın gelişimini sürdürür. Daha ileride IFN $\gamma$  salabilen CD4+ T Hücreleri bir araya toplar. IFN $\gamma$  tüberküloz kontrolünde önemli olmasına rağmen o mikobakteriyi kapsamakta tek başına yeterli değildir. Fakat TNF- $\alpha$  'ın salınımı için makrofajların uyarımında önemli rol oynar. TNF- $\alpha$  , inflamasyonun sürmesi için önemlidir ve granuloma oluşumuna yardım eder ve bu organizmayı sarar ve onun yayılmasını sınırlar. TNF- $\alpha$  'ın bir eksikliği aktif Tüberkülozun yayılmasına yol açar. Infliximab gibi anti- TNF ajanları ile muamele olan hastalar akciğer dışı TB geliştirebilir ve hastalık yayılabilir. Infliximab kullanılırsa PPD+ hastalara tedavi olarak antitüberküloz verilmelidir (5,26).

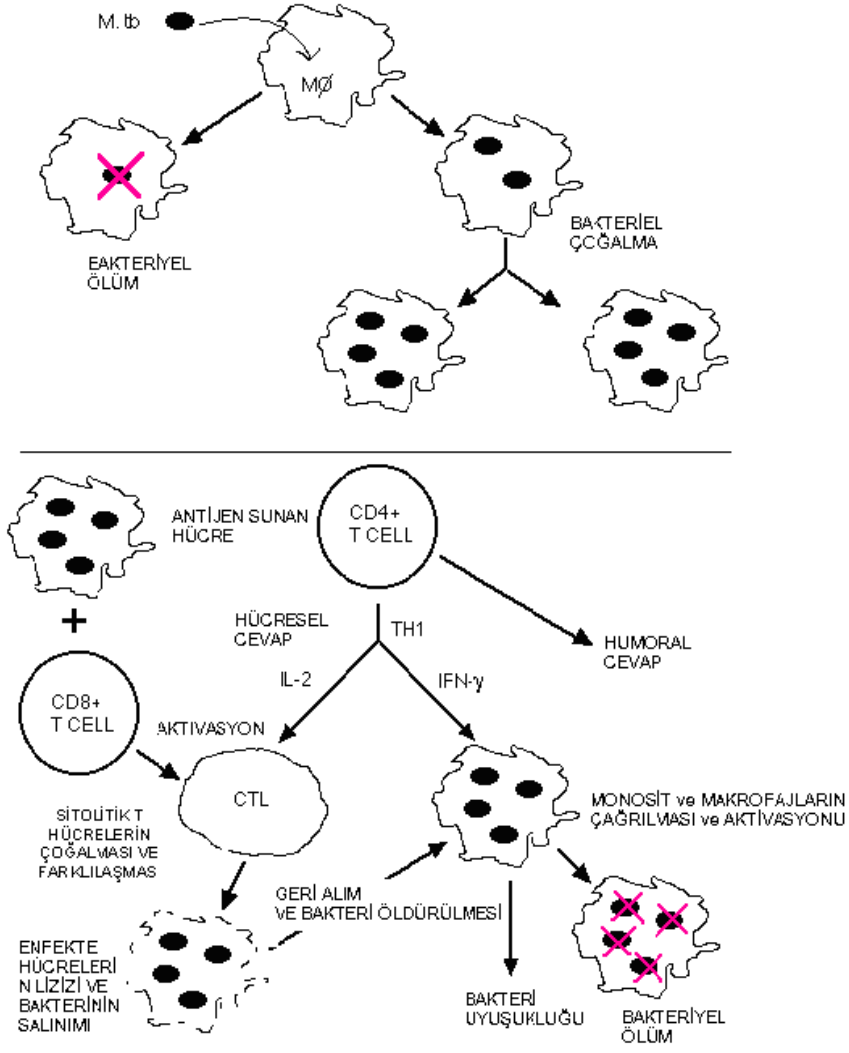
Tüberküloz, enfeksiyonun ardından ertelenmiş bir aşırı hassaslık reaksiyonu geliştirir ve bu aşırı hassaslık reaksiyonu saflaştırılmış protein türevine( PPD) karşıdır. Tüberküloz, PPD reaksiyonu pozitifdir (42). Bağışıklığı baskılanmış olan hastalarda, PPD negatif kalabilir. Tüberkülozlu hastaların çoğu subklinikdir. Tüberküloz,

bulaştırılan kişilerin sadece %3–5’ inde görülür. Diğer % 95–97’ i belirti göstermez, fakat asemptomatik kişilerin %5’ i ömürleri boyunca tüberküloz geliştirebilir (26).

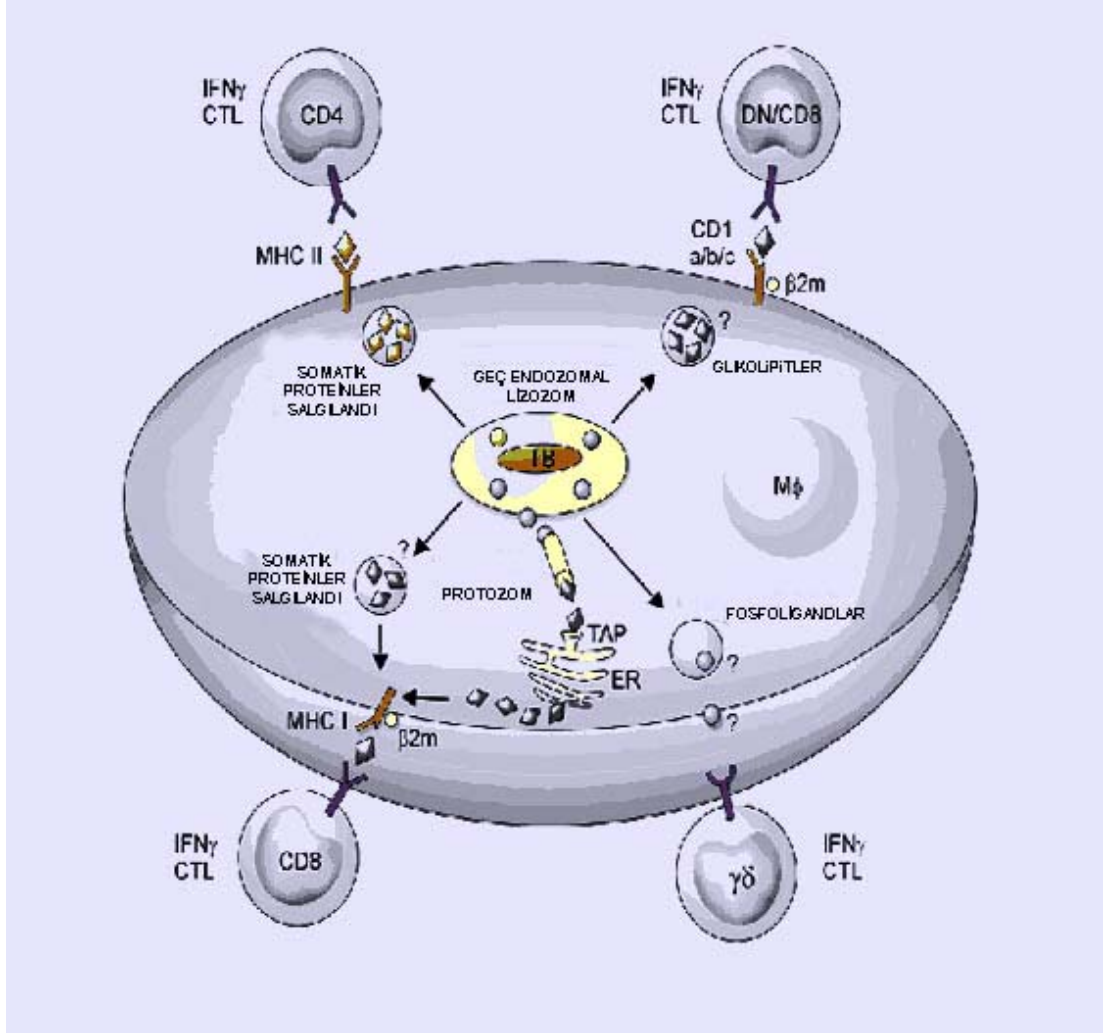
Hedef hücreye bulaştırılan basillerin yaşayabilirliklerine, apoptosisin etkisini ilgilendiren çalışmalar çelişkili sonuçlar gösterdi. Sonuçlar gösterdi ki MTB ile infekte makrofajlara ATP’ nin ilavesi hücre intiharları ve basilin yok olması ile sonuçlandı (43). Bununla beraber bu, ATP aracılı Pürinerjik reseptör aktivasyonun fagozom- lizozom füzyonunu yönettiği ve mikobakterinin büyümesi için uygun olmayan fagozom içi Ph’ ında anlamlı değişimleri uyardığının kanıtıdır (44).



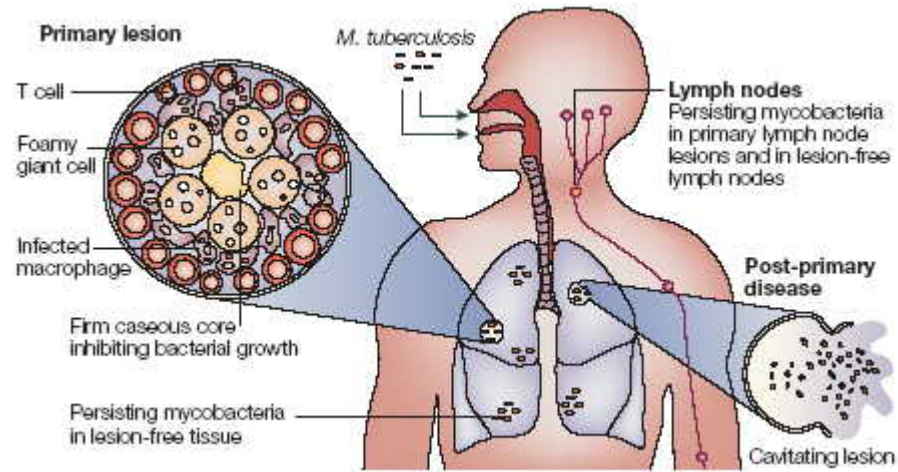
Şekil 2.3. Bir makrofajın Tüberküloz patojenini yutması (45)



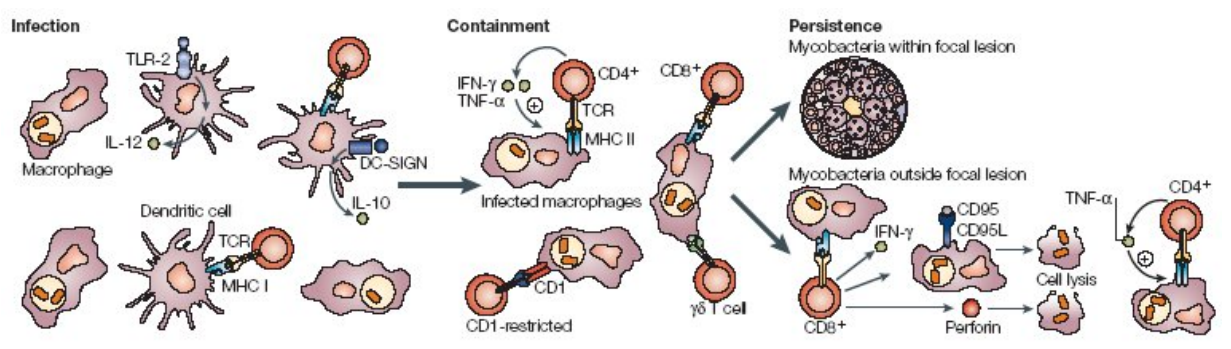
Şekil 2.4. TB Bulaşımı (46)



Şekil 2.5. TB' a karşı koruyucu immünitede T hücre populasyonları ve antijenler(47):



Şekil 2.6. TB patogenezi (48)



Şekil 2.7. TB persistansı (49).

## 2.2. İnsan Genetiği ve Tüberküloza Yatkınlık

Gen polimorfizmleri (“single nucleotide polymorphisms”), genomik DNA’nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır (50)

Geleneksel görüş, mikobakterilerin eşit virülansa sahip olduğu şeklinde olsa da, topluma dayalı yapılan genotipleme çalışmaları, az sayıdaki suşun toplumdaki vakaların çoğundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar, farklı *M. tuberculosis* suşlarının konak ile değişik ilişkiler kurduğunu ve bulaş potansiyellerinin birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir(51, 52)

Son elli yılın üstündeki bir seri çalışma gösteriyor ki; konağın genetik faktörleri TB’ e yatkınlıkta etkilidir (53, 54). Önceki çalışmalarda Mikobakteriye yatkınlıktaki genlerin bazıları açığa çıkmasına rağmen, genetik yatkınlık faktörlerinin kapsamlı anlaşılması önemli bir amaçtı ve bulunamadan kaldı (53) .

TB’e genetiklerin rolünü desteklemek için dört büyük kanıt vardır:

Birinci kanıt, ikiz çalışmaları işaret ediyor ki tekyomurta ikizleri arasındaki TB oranları çift yumurta ikizlerin oranlarının iki katı (çift yumurta ikizlerine karşı tek yumurta ikizleri için her 100 ikiz için 14,9 TB’ e karşı 31,4,  $P < 0.05$ )(55) .

İkinci kanıt, Bir kaç primer immün eksiklik bozuklukları, yüksek tutunumlu nadir tek gen mutasyonlarına katkıda bulunan bir mendeliyan tarzda mikobakteriye yatkınlıkla ilişkilidir. Bu bozukluklar bazı kombine immün yetmezliği içerir, hiper-immunoglobulin (Ig) E sendromu, Kronik gramatoz hastalık, immün eksiklikli anhidrotik ektodermal displazi, hyper-IgM sendromu ve Mikobakteriyel hastalığa Mendeliyan yatkınlık (MSMD)(53). Bozuklukların bu son grubu Mycobakteriyel infeksiyon ilişkisi daha seçici ve diğer patojenlere aşırı yatkın değil fakat bazen Salmonella’ ya yatkınlığı var. Son on yılın üstündeki önemli çalışma serilerinde, tek gen defektlerinin sayısı tanımlandı ki T hücreleri tarafından ortaya koyulan IL-12 ve IFN $\gamma$ , makrofajları aktivasyonunu ve sonrasında organizmanın ölümünü sağlar. Tanımlanmış mutasyonlu genler IL-12Rb1, IL-12p40, IFN-gR1, IFN-gR2 ve sinyal transducer ve transkripsiyon-1’in aktivatörü (STAT-1) içerir. Mendeliyan bozuklukluklarla ilişkilendirilmiş infeksiyonların çoğu BCG ve çevresel bakterilerdendir. Bununla birlikte, bozuklukların bazıları Mtb’ ye yatkınlıkla (MSMD’den biri IFN-gR2 ve IL-12p40) ilişkilendirilmiştir. (53, 56).

Konak genetiği ve TB yatkınlığı için üçüncü kanıt; kompleks kalıtım örneği çalışmalarından geliyor. Genetik etkinin poligenik olduğu ve herhangi düşük etkili tek alel ile popülasyonda ortak olan alellere katkıda bulunduğu farzediliyor. TB’ ye yatkınlığın birkaç geniş genomik çalışmaları aile temellendirilmiş soy araştırmalarıyla oluşturuldu. Bu araştırmalar Kanada popülasyonunda 2q35 içeren birkaç lokusta



tanımlandı (57). Fasdaki bir çalışmada 8q12–13 (58), Brezilyadaki 17q11.2 (59), ve Gambiya ve Güney Afrika popülasyonlarında 15q and Xq (60). Afrikadaki ailelerde (Gambia, Guinea, Güney Afrika) 15q lokusunun beş haritası gösteriyorki Ube3a veya yakın bir gen neden olan lokusu içerebilir (61). Bunlarla ilişkili belli başlı genleri tanımlama çabası devam ediyor.

Dördüncü kanıt; aday genlerle ilişkili çalışmalardan geliyor. Aday genlerde ortak polimorfizm olup olmadığını değerlendiren bu çalışmalar hastalığa yakınlıkla ilişkilendirildi. Tasarlanan en ortak çalışma kontrol ve vakalar arasındaki polimorfizm (single nucleotide, insertions, deletions, or microsatellite markers) frekanslarının kıyaslanması ile bir vaka-kontrol düzenindedir. Tasarlanan bu çalışmanın önemi gücü geniş topluluk boyutlarının kapasitesidir. Heterogenik veya karışık toplumlar bir dezavantajdır. Vaka ve kontroldaki etnik kompozisyondaki farklar, hastalığa yakınlıkta farklılığa katkıda bulunamayan hatalı ilişkilere yol açabilir.

Karışık toplumları kontrol için etnik açıdan uygun vaka ve kontrolleri içermesi gerekiyor. İlâveten bir genomik kontrol seti olarak farklı etnik gruplardan seçilmiş bağımsız SNP' ler ile genotiplendirme yapılarak popülasyon karışımının ince delili incelenebilir. Bu yaklaşım son zamanlarda birkaç TB vaka-kontrol çalışmalarında kullanıldı (62, 63).

Tuberküloza karşı bağışıklık IFN- $\gamma$  ve IL-12 yi içerir bundan dolayı IFN- $\gamma$  ve IL-12 sitokinlerin reseptörlerindeki defektlerde Tuberküloza yakınlığın arttığı biliniyor (70). IFN- $\gamma$  genleri tahrip edilmiş farelerde TB hastalığına yakınlığın olduğu bildirilmiş (11). *M. tuberculosis*' i öldüren bağışıklığın nasıl olduğu hakkında kesinlik çok azdır. Bağışıklık *M. tuberculosis*' i öldürülmeğe rağmen çoğunlukla latent duruma itiliyor olabilir (64).

### 2.3. İnterferon Gamma

İnterferonlar, İnterferon alfa, beta, gamma' yı içeren küçük bir sitokin grubudur. Gamma formu pleiotropik bir sitokindir ve immün sistemin fonksiyonu ve gelişiminin regülasyonunda önemli rol oynar. O çoğunlukla her iki T hücre tipi (CD4+ ve CD8+) ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilirler. Ve O, Nosun indüksiyonu ile tanımlanan makrofajlardaki bir Mikobakteri öldürücü yanıtı uyarır (65, 66). Aktive olmuş T hücre popülasyonları iki ayrı alt gruba bölünürler, yardımcı T hücre 1 (Th1) ve yardımcı T hücre 2 (Th2), yardımcı T hücrelerin ikisinde farklı sitokinleri üretirler. Farede, Th2 hücrelerinin IL-4, IL-5 ve IL-10 ürettiği tanımlanırken Th1 hücreleri farede, IFN-gamma, IL-2, TNF üretiliyor olarak tanımlandılar. Bu alt üniteler birbirlerini çapraz olarak regüle ederler ve iki alt popülasyon arasındaki denge immün bozukluklar ve enfeksiyonun kontrolü için kritiktir. İnsanda, IFN-gamma geni dört ekson içeriyor ve 12q15 de D12S335 ve D12S313 microsatellitlere sıkıca yerleştirilmiştir (67, 68)

IFN- $\gamma$  tip II IFN 'un bir tipidir. O yapısal olarak Tip I IFN den farklıdır. Farklı reseptörlere bağlanır ve ayrı bir kromozomal lokus tarafından kodlanır. Başlangıçta IFN  $\gamma$ ' yı yalnızca CD4+ T yardımcı T hücreleri ve CD8+ sitotoksik lenfositlerin ürettiği düşünülürdü. Bununla birlikte, B hücreleri, NK, T hücreler ve profesyonel antijen sunan hücreler gibi diğer hücrelerinde IFN- $\gamma$  salgıladığına

yönelik kanıtlar var. Profosyemel antijen sunan hücreler (monosit/makrofaj, dendritik hücreler (DCler)) tarafından IFN- $\gamma$  üretimi yakın hücrelerin aktivasyonu ve kendi hücre aktivasyonu için önemli olabilir. T lenfositlerin adaptif immün cevapda majör kaynağı IFN- $\gamma$  iken muhtemel profosyemel APC'ler ve NK hücreleri tarafından IFN- $\gamma$ 'nin salgılanması enfeksiyona karşı erken konak savunmasında önemli olabilir. IFN- $\gamma$  üretimi, APC'ler tarafından salgılanan sitokinler tarafından kontrol edilirler, en dikkat çekicilerde, IL-12 ve IL-18 dir. Bu sitokinler innate immün cevapta IFN- $\gamma$  üretimi ile enfeksiyon arasında bir köprü hizmeti görür. Çoğu patojeni Makrofajın tanınmasıyla, IL-12 ve kemokinlerin salgılanması uyarılır (MIC1). Bu kemokinler, inflamasyon bölgesindeki NK hücrelerini etkiler. IL-12 bu hücrelerdeki IFN- $\gamma$  sentezini artırır. Makrofajlarda NK ve T hücreler, IL-12 ve IL-18 kombinasyonu, IFN- $\gamma$  üretimini daha artırır. IFN- $\gamma$  üretiminin negatif düzenleyicileri IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  ve glukokortikoidleri içerir (118).

IFN- $\gamma$  öncelikle Jak-Stat yolunu kullanarak sinyalleşir. Bir yol, gene regülasyonunu etkilemek için 50'nin üstünde sitokin, büyüme faktörleri ve hormonlar kullanılır. IFN- $\gamma$  cevap genlerinin çoğunun transkripsiyonu bir GAS ya da ISRE element tarafından kontrol edilir(118).

IFN- $\gamma$ , Klâs I MHC'nin genelinin yüzeyinde sunulmuş olan peptitlerin sayısı ve çeşitliliğini arttırmak için Tip I ve II IFN Klâs I antijen sunum yolunda, birçok fonksiyonu up regüle eder. IFN- $\gamma$  tarafından MHC klâs I'in hücre yüzeyindeki up regülasyonu hücre içi patojenlere konak cevabı için önemlidir. Çünkü yabancı peptitlerin sitotoksik T hücreleri tarafından tanınma potansiyelini artırır ve böylece hücre aracılı bağışıklık uyarımını yönetir. IFN- $\gamma$  tek başına Klâs II antijen yolunu up-regüle edebilir ve böylece CD4+ T hücrelerinin peptide özel aktivasyonunu yönetir. IFN- $\gamma$  profosyemel APC'lerin genlerini ekspresse ederken profosyonel olmayan APC'lerin genlerini ekspresse edemez. Dahası MHC sınıf II'yi profosyoneller upregüle ederken profosyonel olmayanlar uyarabilirler. IFN- $\gamma$ , Th1 hücrelerinin ana ürünüdür. Dahası Th1 fenotipine doğru immün cevabın yönelmesini sağlar. IFN- $\gamma$ , karakteristik Th1 efektör mekanizmaları yöneterek bunu gerçekleştirir: Innate hücre aracılı bağışıklık (NK hücre efektör fonksiyonların aktivasyonu ile), Spesifik sitotoksik bağışıklık (T hücreleri APC interaksyonu ile) ve Makrofaj aktivasyonu (118).

Birçok raporlar işaret ediyor ki; IFN- $\gamma$  makrofaj hücre döngüsünde tutsak kalır ve bir yaşam sinyali sağlarken proapoptotik sinyal olarak hizmet veren diğer sinyalleride sağlar(118).

IFN $\gamma$  Fare çalışmaları ve MSMD'li insan araştırmaları gösterir ki, IFN $\gamma$  Mikobakteriye karşı savunmata kritiktir ve böylece onu kodlayan gen polimorfizme açıkca adaydır ortak yakınlıkları değiştirip, fonksiyonlarını etkiler (69). "*Bacillus Calmette Guérin*" (BCG) dâhil tüm mikobakteri kökenli hastalıklara yakınlığı, IFN $\gamma$  reseptör defektlerinin arttırdığı çalışmalarda gösterildi.(2).

Kısmi IFN- R eksiklikleri, IFN-gamma R1 ve IFN- gamma R2' nin her ikisinde değişmeler olmasına sebep olmuş. Akraba olanlarda cytoplasmic domaindeki bir mutasyonda, reseptörün recycling/internalizationu ve sinyalini

karıştırırken, bir formda , IFN- R1'in extracellular parçasındaki bir değişme IFN-  $\gamma$  bağlanma afinitesini uyarır, IFN- R2 ' nin extracellular domaininde tek amino asit değişmesi tanımlandı. Bu değişim, IFN- $\gamma$  ya cevabı yok etmedi. Kısmi bir dominant IFN- R1 eksikliğine, IFN- R1 'de küçük bir frameshift delesyonu sebep olduğu birkaç ilişiksiz akrabalıklarda tanımlandı. Kısalmış proteinler, hücre yüzeyinde birikir ve IFN- $\gamma$ ' yı bağlar, fakat eksiklik bir hücre içi geri dönüştürme bölgesi olduğundan hastalık üzerinde baskın bir negatif etki gösterir. Heterezigotlarda IFN- R1 dimerlerinin çoğu, en az bir defektif alt üniteye sahiptir ve fonksiyon dışıdır. Fakat az da olsa normal dimerler vardır ve fonksiyoneldir. Kısmi IFN- R 'lü hastalar için prognoz, nispeten iyidir ve çoğu, genç yetişkinlik yıllarında tedavisiz kurtarıldı. IL-12B mutasyonlu hastalarda, tam bir IL-12p40 eksikliği var, ne monositler ne de dendritik hücreler, uyarının ardından IL-12'i salgılamadılar. Onların lenfositleri normalden daha az IFN-gamma salgılar. BCG enfeksiyonları, tam IL-12 eksikliği olan tüm hastalarda görüldü. Ve ufak bir grup, atipik mikobakteri veya Salmonella enfeksiyonuna yakalandı. IL-12RB1 'de ki mutasyonlar, genellikle IL-12 reseptör subunit IL-12R $\beta$ 1 'in tam bir eksikliğine sebep olur, eksojen IL-12'e tepki göstermeyen, düşük IFN- $\gamma$  üretimiyle sonuçlanıyor. Bu hastaların, tedavi edilebilir BCG' leri ve atipik mikobakteriyel enfeksiyonları var ve yarısı kadarında Salmonella enfeksiyonları var. Bunlarda bir X' e bağlı resesif kısmi eksiklik bile tanımlandı. Yalnızca bir ölüm, bildirildi ve aile akrabalıkları arasında klinik durumlarında değişimler var. Belgelenmiş mutasyonlu bireyler tamamen asemptomatikken, kardeşlerinde yayılmış BCG enfeksiyonu vardı. Bu değişim, IL-12 sinyali olmadığında onu diğer sitokin uyarıcısı olan IFN-gamma'nın telafi edebildiğini gösterir (53). IL-12 p40 altünitesini IL-23 ile paylaşır ve IL-23 reseptör, IL-12 $\beta$ 1 altünitesinide paylaşır bu yüzden Bu genlerdeki defektler IL-23 sinyalinde bile eksikliklere yol açar (70).

Tam STAT-1 eksikliği akraba olmayan iki bebekte tanımlandı. Onlar yayılmış BCG enfeksiyonlardan kurtulmuş olmalarına rağmen her ikisi, şiddetli viral enfeksiyonlarından öldü, tahminen STAT-1 'de ki bir kusurun sonucu, interferon  $\alpha$ ' nın sinyaline aracılık etti. Bunuda ISRE ( IFN- ardışıklık cevabı ögesi) aracılığı ile yaptı ki ISRE, anti-viral immünitete anahtardır. Hem STAT-1 fosforilasyonu hemde DNA bağlanmasını bozan farklı mutasyonların Kısmi STAT-1 eksikliklerine sebep olduğu bulundu (71). Bu mutasyonların bazıları, heterezigot durumda (baskın özellik) mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık gösterir, fakat homozigotken sadece viral enfeksiyonlara yatkındırlar ( resesif özellik) (69).

Genetik defekli olan akrabalıklarda mikobakteriyel enfeksiyona yatkınlık saptanmış ki bu defektler çocukluk TB' nin büyük bir oranından sorumlu olabilir (69).

#### **2.4. Pürinerjik Reseptörler**

P2X7 reseptörleri yedi homomerik reseptör alt tipi içeren ATP' a hassas iyonotropik P2X reseptörleri ailesine mensuptur (P2X1-P2X7) (72). Bu reseptör alt tiplerinin bazıları P2X2/3 gibi fonksiyonel heteromerik reseptör kombinasyonları vardır (72) bununla birlikte P2X7 reseptörleri P2X ailesi arasında tektir ki bunlar sadece homerik form olarak fonksiyon gösterir ve yüksek ATP konsantrasyonları ile

fonksiyon gösterirler (4100 mM) (73). İlaveten uzun dönem agoniste maruziyet hücre membranında büyük sitolitik form oluşumuna sebep olur (74). Öncelikle RAT' larda klonlandı (74) ve sonra insan beyinde (75) ve insan makrofajlarında klonlandı (76). P2X7 reseptörleri mast hücreleri, lenfositler, eritrositler, fibroblastlar periferel makrofajlar ve epidermal langerhans hücrelerini içeren Hematopoetik kök hücrelerde ekspresse edilirler (74).

Pürinler ile onların nükleozit ve nükleotid formları, gerek enerji metabolizmasında gerekse genetik materyalin oluşturulmasında oynadıkları rol açısından, tüm hücrelerde olmazsa olmaz moleküllerdendir. Bu iki temel görevin yanısıra, hücre içi ve hücreler arasındaki iletişime de önemli katkılar sağlarlar. Bu iletişim, hücre yüzeyinde yerleşmiş reseptörler aracılığı ile gerçekleşir. Pürinerjik reseptör (pürinoseptör) ailesi beş alt gruba ayrılmıştır:

- a) Adenin reseptör grubu
- b) Yapısal (Metabotropik) nükleotid (P2Y) reseptörler
- c) İyonotropik nükleotid (P2X) reseptörler
- d) Dinükleotid reseptörler
- e) Adenozin reseptörleri (77)

Pürinerjik reseptörler yüksek derecede makrofajlarda ekspresse olurlar ve ATP uyarımı ile mikobakterinin ölümüne aracı olurlar. P2X7' nin uyarımı ikili katyon kanallarının açılımına, kalsiyum geçişine, kaspasın uyarımına ve sonuç olarak apoptosise sebep olur. Mikobakterinin ölümü ve fagozomal füzyonu yöneten Fosfolipaz D aktive edilir (12).

Bununla birlikte, Bu reseptör alt tipinin fonksiyonunun diğer P2X7 reseptörlerinin genel özelliklerinden ayrı olduğunu göstermek oldukça güçtür. P2X7 reseptörlerinin en az 250 polimorfik formu tanımlanmış (78) bu çeşitler arasında, fonksiyonun hem kazancı (79) hemde kaybına (80) sebep olan tek nükleotid değişiklikleri (SNP' ler) raporlandı. Bu SNP' lerin bazıları akciğerdışı Tüberküloz için (3) bir biomarker olarak tahmin etmede işe yararken bu tarihe kadar özel bir P2X7 polimorfizminin hastalıkla ilişkisi açık değildi.

P2x7 reseptörünün polimorfik formlarının çeşitliliği, diğer P2X7 reseptörleriyle alakalı reseptörlerin C terminal bölgesinin uzunluğunun uzaması ile alakalıdır. Bu bölge reseptör aracılı sitosolik por oluşturma aktivitesi için temeldir (74). Ve ayrıca lipopolisakkaritler için birbirini etkilediği varsayılan bölgeler içerir (81); SH2 domainleri ve a-aktin gibi (82). P2X7 reseptör aktivasyonunun mekanizmaları hücre membranında büyük sitosolik por oluşumlarına yol açar ki bunların kesinliği saptanamadı. Elde edilen kanıtlar P2X reseptörünün minimum sitokiyometrik konformasyonun bir trimer olduğuna işaret ediyor. Bununla birlikte Bu iş, potansiyel downstream sinyal mekanizmalarındansa P2X reseptörlerinin kanal iletkenliklerinin analizine dayandırılıyor. P2X reseptörlerinin sitokiyometrik özellikleri P2X7 reseptöründense önce diğer alt tiplerde çalışılarak tanımlandı (83). Kanalın içinin genişlemesi ile por oluşumu temel hipotez iken (72), İn vitro por oluşumuna yol açmış agonisti göstermek için katyon geçirgen reseptör ekspresse eden bazı hücre tipleri por oluşumuna P2X7 reseptör aracılı downstream sinyallerin sebep olduğunu

gösteren verilerin oluşumuna yol açtı (84, 85). Por oluşumu hücre yüzeyinde nonselective hemichannelsin açıklığına bağlı olabilir (86)

Pürinerjik reseptörler, immün sistem ve kandaki hücrelerde bulunan katyonik kanallardır ve makrofajlarda yüksek derecede ekspresse edilirler (87). P2X7 reseptörü ekstrasellüler ATP ile aktive edilir ki ATP apoptosise yol açan kaspaz kaskatının uyarımını ve kalsiyum girişine yol açarak katyon seçici kanalların açılımına sebep olur. Bir kalsiyum bağımlı fosfolipaz D yolu dahi aktive edilir, bu aktive edilen yolda, fagolizozomal füzyonunu ve mikobakterinin ölmesini sağlar (87).

P2X7' de promoter bölgesinde birkaç polimorfizm bulunuyor. Bu bölgeler; Bir ATP bağlanma domaini, bir trafficking domain ve bir ankryln benzeri tekrar domaini (A1513C, E496A). Kodlanan bölge polimorfizminin birkaçının çalışmaları, ATP ile uyarılmış apoptosis gibi, ATP ile uyarılmış Etidyum alımının azalması ile defektler fonksiyonel olarak gösterilmiştir (88, 89). İki vaka-kontrol çalışmaları TB yatkınlığı ile P2X7 SNP' lerin ilişkisi bulundu. Fonksiyonu tam bilinmeyen bir promoter polimorfizmi Gambia' da pulmoner TB ile ilişkilendirildi (alel frekansı vakalarda 0.254, kontrollerde 0.329 veya 0.70) (7). Sydney, Avustralya' da A1513C SNP' nin son bir çalışması pulmoner TB değil fakat akciğer dışı TB ile ilişkisi gösterildi. (Akciğer dışı TB için O.R. yaklaşık olarak 3,1–4,0,  $P < 0.01$ ) (3). Bu çalışmanın bir gücü iki ayrı toplulukta bulunanların replikasyonudur. Olası hastalıklar farklı şehirlerin bir sayısından konularla populasyon heterojenliğinin boyutları ve derecelerinin küçük örneklerini içerir. A1513C polimorfizmi ATP ile uyarılmış makrofajlarda MTb ve BCG' nin öldürülmesinin zayıflatılması ile ilişkilidir (3, 90). Sadece bu SNP MTb' yi öldürmek için Makrofajın yeteneğini değiştiren etkili fonksiyonun zayıflatılmasıyla ilişkili olduğu biliniyor.

## BİREYLER VE YÖNTEMLER

### 3.1. Olgular

Bu çalışmaya Antalya Verem Savaş Dispanserin'de izlenen ve TB hastalığı ile tutarlı klinik ve radyolojik bulguların varlığı, balgam ya da açlık mide suyu değerlendirilmesinde en az iki ARB pozitifliği olan veya balgamda, bronşial lavaj sıvısında ve /veya plevral sıvıda ve diğer organ sistem sıvılarında *Mycobacterium Tuberculosis* için kültür pozitifliği ile kesin akciğer tüberkülozu tanısı almış 100 hasta alındı.

Marmara Üniversitesi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı'ndan Prof.Dr. Mustafa Bakır tarafından birimize gönderilen PPD(+) , ELİSPOT(+) ancak TB hastalığı olmayan 134 çocuk çalışmaya alındı. 100 sağlıklı kontrol hastanemize başvuran sağlıklı donörlerden onamları alınarak seçildi.

Araştırmaya alınma kriterleri:

PPD(+) , ELİSPOT(+) ancak TB hastalığı olmayan 134 çocuk ve 100 sağlıklı kontrol grubu, ayrıca TB hastalığı hem radyolojik hemde balgam ya da açlık mide suyu değerlendirilmesinde en az iki ARB pozitifliğinin olması veya balgamda, bronşial lavaj sıvısında ve /veya plevral sıvıda ve diğer organ sistem sıvılarında *Mycobacterium Tuberculosis* için kültür pozitifliği ile kesin Akciğer Tüberkülozu tanısı almış 100 hasta alınması.

### 3.2. DNA İzolasyonu

Tüberküloz tanısıyla izlenen hastalardan 2 cc kan EDTA içeren tüpe alınıp DNA izolasyon kitinin protokolüne göre DNA' lar ayrıldı. Gentra DNA Ekstraksiyon kit kullanılarak yapılan DNA izolasyon yöntemi, aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

- a. 300 µl. kan, 900 µl “red blood cell lysis” ile karıştırıldı. 15 dk. oda ısısında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- b. 1750 g. de 1 dk santrifüj edildi (Heraeus marka Megafuge 1.0R).
- c. Süpernatant atıldı.
- d. Dipte kalan hücreler 300µl “cell lysis” solüsyonu ile karıştırıldı.
- e. Hücreler cell liziz ile iyice pipetaj yapıldı.
- f. 100 µl “protein precipitation” solusyonu da eklendi ve 15 sn. vorteks ile iyice karışması sağlandı.
- g. 1750 g. de 1 dk. santrifüj edildi.
- h. Süpernatant başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 300 µl. isopropanol ilave edildi. Tüp elle sallanarak DNA' nın kondanse hale gelmesi sağlandı.
- i. 1750 g. de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- j. 300 µl %70' lik etil alkol eklenip karıştırıldı.
- k. 1750 g. de 1 dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- l. Dipte kalan DNA 100 µl “dehidratation” solüsyonu ile sulandırıldı.

İzole edilmiş olan DNA örnekleri IFN $\gamma$  -155 ile -183 promoter ve P2X7 A1513C polimorfizmleri açısından bireylerin genotiplendirilmesinde kullanıldı. Ve Amplifikasyonlar yapılına kadar -20 C de saklandı.

### 3.3. IFN Gamma Promoter için PCR

PCR için DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer) cihazı kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonu için: 1X reaksiyon buffer'ı, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, aşağıda dizilimi yazılı olan primerlerden 0.5mM, her bir dNTP'den 200mM, 1 Ünite Taq Polimeraz ve 100 ng genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Genotiplendirme yapmak için RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanıldı. RFLP tek baz değişimlerini veya farklı büyüklükte minisatellitleri belirleyebilen bir tekniktir. Restriksiyon Endonükleazlarla DNA'nın farklı büyüklükte fragmanlara ayrılarak incelenmesi esasına dayanır. Genotiplendirme, polimorfizm çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Amplifikasyon için termal cycler da interferon gamma promoter bölgesi ve P2X7 bölgeleri çoğaltıldı, fenol kloroform ekstraksiyonu yapıldı ve kesim reaksiyonları gerçekleştirildi.

| Polimorfizm pozisyonu | Baz değişimi | PCR Primerleri (sense/antisense)                                    | Annealing Isısı | Uzunluk |
|-----------------------|--------------|---|-----------------|---------|
| —155                  | A-G          | 5'- aat gtg ctt tgt gaa tga -3'<br>5' - ctc ctc tgg ctg ctg gta -3' | 51 C            | 331bp   |
| —183                  | G-T          | 5'- aat gtg ctt tgt gaa tga -3'<br>5' - ctc ctc tgg ctg ctg gta -3' | 51 C            | 331bp   |

**Tablo 3.1:** İnterferon gamma promoterindeki SNPler, kullanılan primerler, annealin ısısı, amplifikasyon ürününün boyu

#### 3.3.1. IFN Gamma Promoter Amplifikasyonu

IFN gamma promoter bölgesi için kullanılan primerler;

Sense (Forward) primer : 5'- aat gtg ctt tgt gaa tga -3' Tm: 51  
Antisense (Reverse) primer : 5' - ctc ctc tgg ctg ctg gta -3' Tm: 62

Primerler' i prospektüsünün önerdiği miktarda sulandırarak 100  $\mu$ molar stok hazırladık. Bu stoğu 10  $\mu$ molar hale getirmek için 10  $\mu$ l stok primer + 90  $\mu$ l H<sub>2</sub>O' ı karıştırdık. dNTP 25 Mmolar bu sebeple 4 nükleotiddende 25  $\mu$ l aldık ve 100  $\mu$ l' lik stok hazırladık.

PCR koşulları:

|        |                            |       |   |                 |
|--------|----------------------------|-------|---|-----------------|
| 95 ° C | ( başlangıç denatürasyonu) | 2 dk  | } | <b>35 döngü</b> |
| 95 ° C | (denatürasyon)             | 30 sn |   |                 |
| 51 ° C | (annealing)                | 1 dk  |   |                 |
| 72 ° C | (uzama)                    | 1 dk  |   |                 |
| 72 ° C | (bitiş uzaması)            | 5 dk  |   |                 |

| <b>RFLP'de kullanılan malzemeler</b> |              |
|--------------------------------------|--------------|
| H2O                                  | 34,2 µl      |
| Buffer                               | 5 µl         |
| Mg+2                                 | 3 µl         |
| dNTP                                 | 0,4 µl       |
| Sense (Forward) primer               | 1 µl         |
| Antisense (Reverse) primer           | 1 µl         |
| Tag                                  | 0,4 µl       |
| DNA                                  | 5 µl         |
| <b>Toplam</b>                        | <b>50 µl</b> |

**Tablo 3.2:** İnterferon gamma promoterindeki SNPler için kurulan PCR da kullanılan malzemeler ve miktarları

PCR sonucunda beklenen 331 baz çiftlik ürün, %2 lik agaroz jelde kontrol edildi. Tag DNA polimeraz, buffer ve Mg+2' u ise Roche marka kullanıldı. dNTP Fermantas marka kullanıldı.

### 3.3.2. IFN Gamma Promoteri için Fenol Kloroform Ekstraksiyonu

Daha sonra PCR ürünleri fenol-kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Fenol-Kloroform ekstraksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi:

- Stok elde etmek için önce fenol ve kloroform eşit miktarlarda karıştırıldı
- Amplifikasyon ürünümüzün üzerine 50 µl steril su ekleyip 100 µl ye tamamladık.
- Üzerine 100 µl hazırladığımız fenol kloroformdan ekledik
- Vorteks yapıp, 5 dakika 10000 rpm de santrifüj ettik
- 500 µl' lik ayrı bir ependorf tüpüne süpernatanı aldık
- Üzerine %10'una denk gelecek şekilde %3 lük sodyum asetat ve ortalama 2 katına denk gelecek şekilde 200–230 µl arasında absolu alkol eklenip 15 dakika -80 de bekletildi
- 15 dakika 10000 rpm de santrifüj ettikten sonra süpernatanı döküp pellet kurumaya bırakıldı
- Kuruduktan sonra 20 µl steril su ile sulandırıldı ve -20 derecede kesim yapılanaya kadar saklandı.



### 3.3.3. IFN Gamma -155 A/G VE -183 G/T için kesim reaksiyonları

| Polimorfizm pozisyonu | Baz değişimi | Uzunluk | Resrtiksyon enzimi | Fragmentlerin uzunluğu (bp) |
|-----------------------|--------------|---------|--------------------|-----------------------------|
| —155                  | A-G          | 331bp   | AluI 1             | 147ve184 bp                 |
| —183                  | G-T          | 331bp   | AvaII              | 156ve175 bp                 |

**Tablo 3.3.** İnterferon gamma promoterindeki SNPler, kesim enzimleri ve amplifikasyon ürünlerinin boyları

#### 3.3.3.1. IFN Gamma -155 A/G için kesim reaksiyonu

| Malzemeler          |     |
|---------------------|-----|
| H2O                 | 6,2 |
| Buffer              | 1   |
| Enzim               | 0,3 |
| Amplifikasyon ürünü | 2,5 |
| Toplam              | 10  |

**Tablo 3.4:** İnterferon gamma -155A/G değişimi için kesim reaksiyonu koşulları

—155 A/G polimorfizmini belirlemek için Roche firmasından satın aldığımız AluI restriksiyon enzimi kullanılarak kesim reaksiyonu oluşturuldu ve 37 C' de 3 saat inkübasyondan sonra EtBr (ethidium bromide) ile boyanmış %3 agaroz jel de UV transilliminatorde bakılarak genotipler belirlendi. Bu kesim sonucunda Alu I restriksiyon enzimi, yabancı bireylerde amplifikasyon ürününü kesmezken polimorfik kişilerde kesim yapmaktadır.

#### 3.3.3.2. IFN Gamma -183 G/T için kesim reaksiyonu

| Malzemeler          |     |
|---------------------|-----|
| H2O                 | 5,5 |
| Buffer              | 1   |
| Enzim               | 1   |
| Amplifikasyon ürünü | 2,5 |
| Toplam              | 10  |

**Tablo 3.5:** İnterferon gamma -183G/T değişimi için kesim reaksiyonu koşulları

—183 G/T polimorfizmini belirlemek için ise yine Roche firmasından satın aldığımız Ava II restriksiyon enzimi kullanılıp yukarıda belirtilen kesim reaksiyonu bu bölge içinde uygulandı. 37 C' de 2 saat inkübasyondan sonra EtBr (ethidium bromide) ile boyanmış %3 agaroz jel de UV transilliminatorde bakılarak genotipler belirlendi. Ava II restriksiyon enzimi polimorfik kişilerde, yabancı kişilerde olduğu gibi 156 bp ve 175 bp' lik bantlar oluşturmayacak 331 bp'lik tek bant görülecektir.

### 3.4. P2X7 için PCR

Genotiplendirme yapmak için RFLP yöntemi kullanıldı. Ve amplifikasyon için termal cycler da P2X7 bölgesi çoğaltıldı, fenol kloroform ekstraksiyonu yapıldı ve kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR için DNA Thermal Cyclers 480 (Perkin Elmer) cihazı kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonu için: 1X reaksiyon buffer'ı, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, aşağıda dizilimi yazılı olan primerlerden 0.5mM, herbir dNTP'den 200mM, 1 Ünite Taq Polimeraz ve 100 ng genomik DNA kalıp olarak kullanıldı.

| Polimorfizm pozisyonu | Baz değişimi | PCR Primerleri (sense/antisense)  | Annealing Isısı | Uzunluk |
|-----------------------|--------------|---|-----------------|---------|
| 1513                  | A-C          | Forward: 5'-TGC CCC TGG CCC TCC A-3'<br>Reverse: 5'-GTC TGG ACA GGA CCA GC-3' | 60 C            | 227bp   |

**Tablo 3.6:** İnterferon gamma promoterindeki SNPlar, primerler, annealing ısı ve amplifikasyon ürününün boyu

#### 3.4.1 P2X7 Amplifikasyonu

Primerler' i prospektüsünün önerdiği miktarda sulandırarak 100 µmolar stok hazırladım. Bu stoğu 10 µmolar hale getirmek için 10 µl stok primer +90 µl H<sub>2</sub>O' ı karıştırdım. dNTP 25 Mmolar bu sebeple 4 nükleotiddende 25 µl aldım ve 100 µl lik stok hazırladım

PCR koşulları:

|        |                            |       |                   |
|--------|----------------------------|-------|-------------------|
| 95 ° C | ( başlangıç denatürasyonu) | 2 dk  | } <b>35 döngü</b> |
| 95 ° C | (denatürasyon)             | 30 sn |                   |
| 51 ° C | (annealing)                | 1 dk  |                   |
| 72 ° C | (uzama)                    | 1 dk  |                   |
| 72 ° C | (final uzaması)            | 5 dk  |                   |

PCR sonucunda beklenen 227 baz çiftlik ürün, %2 lik agaroz jelde kontrol edildi.

Forward : 5'-TGC CCC TGG CCC TCC A-3' Tm: 58  
Reverse : 5'-GTC TGG ACA GGA CCA GC-3' Tm: 57

| RFLP'de kullanılan malzemeler |              |
|-------------------------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O              | 33,5 µl      |
| Buffer                        | 5 µl         |
| Mg <sup>+2</sup>              | 1,5 µl       |
| dNTP                          | 1 µl         |
| Sense (Forward) primer        | 1,5 µl       |
| Antisense (Reverse) primer    | 1,5 µl       |
| Taq                           | 1 µl         |
| DNA                           | 5 µl         |
| <b>Toplam</b>                 | <b>50 µl</b> |

**Tablo 3.7.** P2X7 RFLP-PCR amplifikasyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları

Taq DNA polimeraz, buffer'ı ve Mg<sup>+2</sup>' u Roche marka kullanıldı. dNTP Fermantas marka kullanıldı.

### 3.4.2. P2X7 için Fenol Kloroform Ekstraksiyonu

Daha sonra PCR ürünleri fenol-kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Fenol-Kloroform ekstraksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi:

- Stok elde etmek için önce fenol ve kloroform eşit miktarlarda karıştırıldı
- Amplifikasyon ürünümüzün üzerine 50 µl steril su ekleyip 100 µl ye tamamladık.
- Üzerine 100 µl hazırladığımız fenol kloroformdan ekledik
- Vorteks yapıp, 5 dakika 10000 rpm de santrifüj ettik
- 500 µl' lik ayrı bir ependorf tüpüne süpernatanı aldık
- Üzerine %10'una denk gelecek şekilde %3 lük sodyum asetat ve ortalama 2 katna denk gelecek şekilde 200–230 µl arasında absolu alkol eklenip 15 dakika -80 de bekletildi
- 15 dakika 10000 rpm de santrifüj ettikten sonra süpernatanı döküp pellet kurumaya bırakıldı
- Kuruduktan sonra 20 µl steril su ile sulandırıldı ve -20 derecede kesim yapılana kadar saklandı.

### 3.4.3. P2X7 A1513C için kesim reaksiyonu

| Polimorfizm pozisyonu | Baz değişimi | Uzunluk | Restriksiyon enzimi | Fragmentlerin uzunluğu (bp) |
|-----------------------|--------------|---------|---------------------|-----------------------------|
| 1513                  | A-C          | 227bp   | HaeII               | 165 ve 62bp                 |

**Tablo 3.8.** P2X7 SNP' i, kesim enzimleri ve amplifikasyon ürünlerinin boyları

A1513C polimorfizmini belirlemek için HaeII restriksiyon enzimi kullanılarak kesim reaksiyonu oluşturuldu ve 37 C' de 2,5 saat inkübasyondan sonra EtBr (ethidium bromide) ile boyanmış %3 agaroz jel de UV transilluminatörde bakılarak genotipler belirlendi. Bu kesim sonucunda HaeII restiksiyon enzimi normal

kişilerde kesim yapmayan bir enzim ve sonuçta 227 bp lik amplifikasyon ürününü; polimorfik kişilerde ise kesim yapıyor ve 165 ve 62 bp' lik amplifikasyon ürünü beklememiz gerekiyor.

| <b>Malzemeler</b>   |           |
|---------------------|-----------|
| H2O                 | 18,5      |
| Buffer              | 2,5       |
| Enzim               | 1,5       |
| Amplifikasyon ürünü | 5         |
| <b>Toplam</b>       | <b>25</b> |

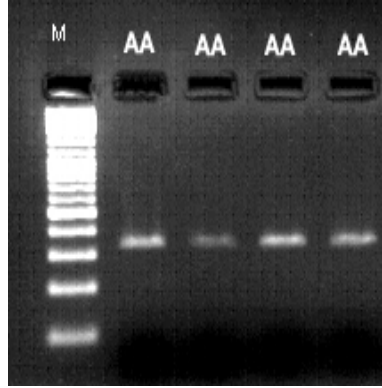
**Tablo 3.9: P2X7 Kesim reaksiyonu koşulları**

## BULGULAR

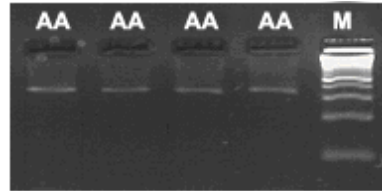
### 4.1. İnterferon Gamma -155 A/G Polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları

Deneyimizde 93 tane Antalya TB hastası, 95 tane İstanbuldan Prof.Dr. Mustafa BAKIR' ın gönderdiği TB hastası toplam 188 TB hastası çalışıldı. Toplamda 81 sağlıklı kontrol çalışıldı. AluI restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonrasında polimorfik GG genotipli bireylerde 147bp ve 184 bp' lik iki bant, yabancı AA genotipli bireylerden 331 bp'lik tek bir bant ve AG genotipli heterozigot bireylerden ise 147,184 ve 331 bp' lik üç bant görmeyi bekliyorduk. Fakat kesimlerimizin sonucunda 331 bp lik tek bir amplifikasyon ürünü gördük (Şekil 4.1 ve 4.2). Tüm hasta ve kontrollerimiz AA genotipli yabancı bireylerdi.

Tüm bu yukarıda anlattıklarımız Çizelge 4.1 da şematize edilmiştir ve Tablo 4.1' da özetlenmiştir. Bulunan tüm genotip frekansları *Hardy-Weinberg* dengesi açısından test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Tüberküloz ve sağlıklı kontroller arasındaki genotip karşılaştırmaları için Ki-kare testi kullanılmıştır (Tablo 4.2).



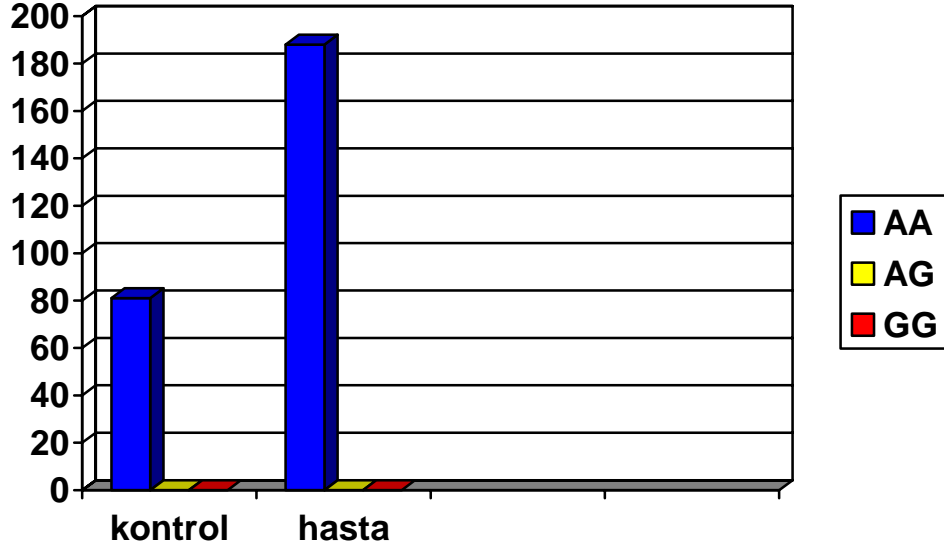
Şekil 4.1. Tüberkülozlu hastalarda İnterferon gamma -155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu



Şekil 4.2. Sağlıklı kontrollerde İnterferon gamma -155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu

|          |              | Kontrol | Tüberküloz |
|----------|--------------|---------|------------|
| Pozisyon | Genotip/alel | n(%)    | n(%)       |
| -155A-G  | AA           | 81(100) | 188(100)   |
|          | AG           | 0(0)    | 0(0)       |
|          | GG           | 0(0)    | 0(0)       |

**Tablo 4.1.** İnterferon Gamma -155 A/G ye göre genotiplendirme yapılan hasta ve kontrollerin dağılımı



**Çizelge 4.1.** İnterferon gamma – 155 A/G polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı

|            |              |                 |                 |
|------------|--------------|-----------------|-----------------|
| <b>A↔G</b> | <b>AA↔AG</b> | <b>AA+GG↔GG</b> | <b>AA↔AG+GG</b> |
| p=1.00     | p=1.00       | p=1.00          | p=1.00          |
| <b>G↔A</b> | <b>GG↔AG</b> | <b>GG+GA↔AA</b> | <b>AA+AG↔GG</b> |
| p=1.00     | p=1.00       | p=1.00          | p=1.00          |

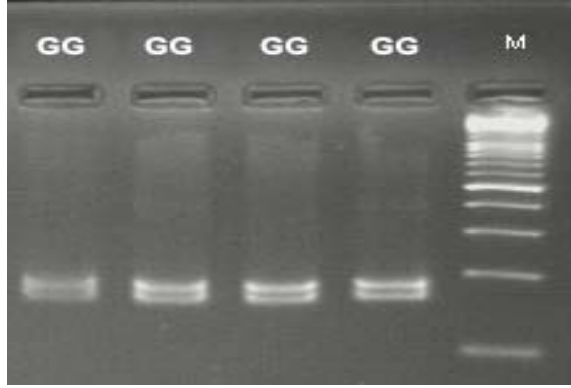
**Tablo 4.2.** İnterferon gamma – 155 A/G polimorfizmi açısından yaptığımız çalışmanın Hardy-Weinberg dengesi (123)

#### 4.2. İnterferon Gamma -183 G/T Polimorfizminin RFLP-PCR Sonuçları

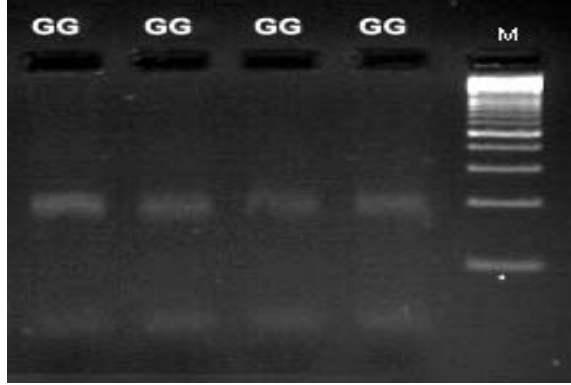
Deneyimizde 82 tane Antalya TB hastası, 83 tane İstanbuldan Prof.Dr. Mustafa BAKIR' ın gönderdiği TB hastası toplam 165 TB hastası çalışıldı. Toplamda 87 sağlıklı kontrol çalışıldı. AvaII restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonrasında yabancı GG genotipli bireylerde 156bp ve 175 bp' lik iki bant, polimorfik TT genotipli bireylerden 331 bp'lik tek bir bant ve AT genotipli heterozigot bireylerden ise 156, 175 ve 331 bp' lik üç bant görmeyi bekliyorduk. Fakat kesimlerimizin sonucunda 156bp ve 175 bp' lik iki amplifikasyon ürünü gördük

(Şekil 4.3 ve 4.4). Tüm hasta ve kontrollerimiz GG genotipli yabancı bireylerdi. Buradan da diyebiliriz ki; IFN  $\gamma$  -183 polimorfizmi bizim toplumumuzda yoktur.

Tüm bu yukarıda anlattıklarımız Çizelge 4.2' de şematize edilmiştir ve Tablo 4.3' de özetlenmiştir. Bulunan tüm genotip frekansları *Hardy-Weinberg* dengesi açısından test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Tüberküloz ve sağlıklı kontroller arasındaki genotip karşılaştırmaları için Ki-kare testi kullanılmıştır (Tablo 4.4).



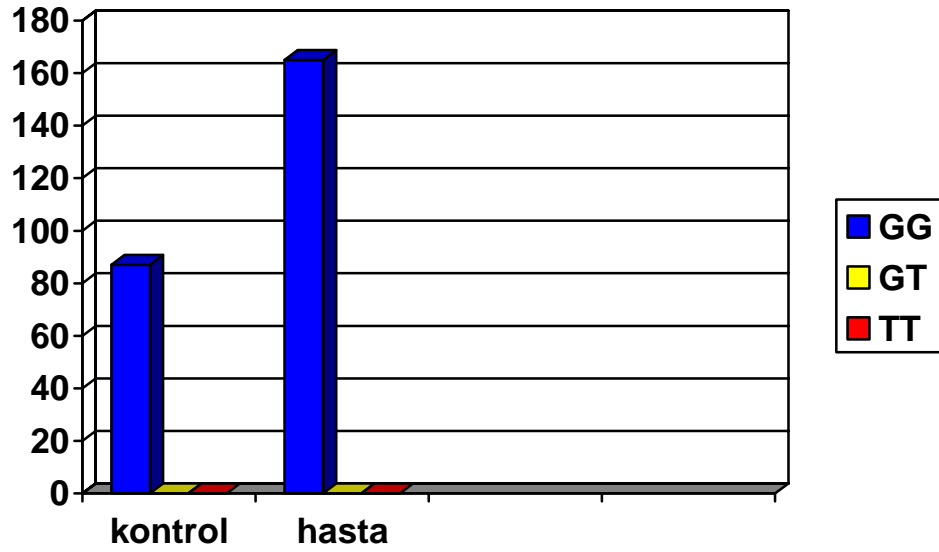
**Şekil 4.3.** Tüberkülozlu hastalarda İnterferon gamma -183 A/T polimorfizminin kesim reaksiyonun sonucu



**Şekil 4.4.** Sağlıklı kontrollerde İnterferon gamma -183 A/T polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu

|          |              | Kontrol | Tüberküloz |
|----------|--------------|---------|------------|
| Pozisyon | Genotip/alel | n(%)    | n(%)       |
| —183A-T  | GG           | 87(100) | 165(100)   |
|          | GT           | 0(0)    | 0(0)       |
|          | TT           | 0(0)    | 0(0)       |

**Tablo 4.3. İnterferon Gamma -183 A/T ye göre genotiplendirme yapılan hasta ve kontrollerin dağılımı**



**Çizelge 4.2. İnterferon gamma – 183 G/G polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı**

| G↔T    | GG↔GT  | GG+TT↔TT | GG↔GT+TT |
|--------|--------|----------|----------|
| p=1.00 | p=1.00 | p=1.00   | p=1.00   |
| T↔G    | TT↔GT  | TT+TG↔GG | GG+GT↔TT |
| p=1.00 | p=1.00 | p=1.00   | p=1.00   |

**Tablo 4.4. İnterferon gamma – 183 G/T polimorfizmi açısından yaptığımız çalışmanın Hardy-Weinberg dengesi (123)**

#### 4.3. P2X7 A1513C Polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları

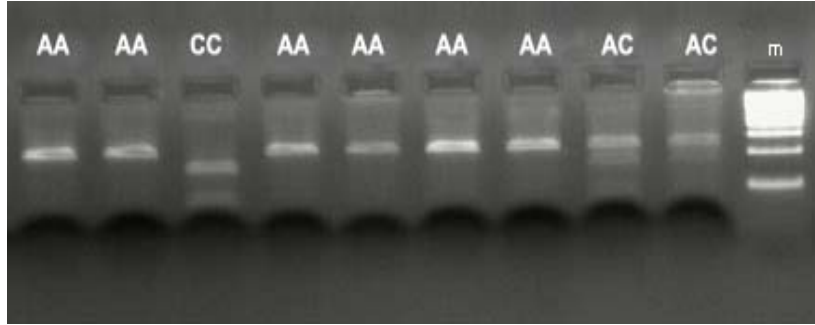
Deneyimizin sonucunda Toplam 139 hastadan 89' ında kesim görülmedi. Yani yabancı bireylerdi. 7 tanesinde tam kesim vardı mutant CC genotipli bireylerdi ve 43 tanesinde 227, 165, 62 üç amplifikasyon ürünü görüldü bu bireylerde heterozigot bireylerdi.

Toplam 118 sağlıklı kontrolden 85' ında kesim görülmedi, hepsi yabancı bireylerdi. 6 tanesinde tam kesim görüldü ve bunlar mutant CC genotipli bireylerdi

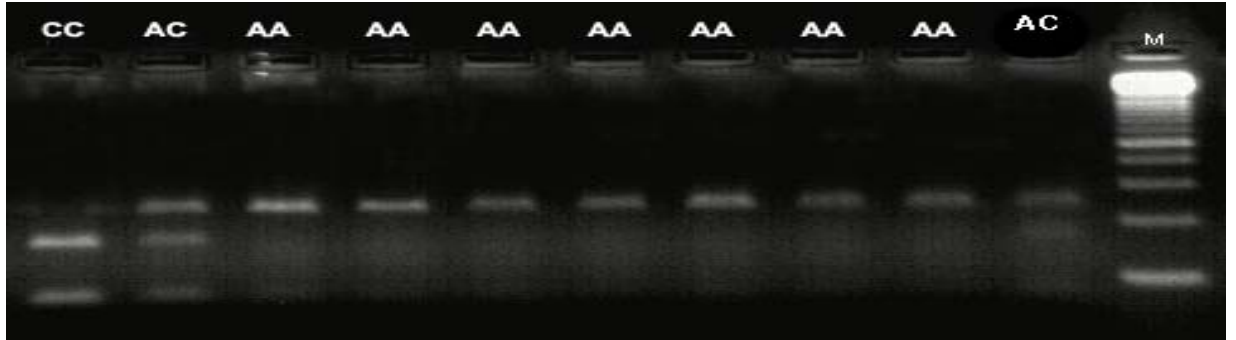


ve 27 tanesinde 227, 165, 62 üç amplifikasyon ürünü görüldü. Bu bireylerde heterozigot bireylerdi. (Şekil 4.5 ve 4.6 )

Tüm bu yukarıda anlattıklarımız Çizelge 4.3' da şematize edilmiştir ve Tablo 4.5' da özetlenmiştir. Bulunan tüm genotip frekansları *Hardy-Weinberg* dengesi açısından test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Tüberküloz ve sağlıklı kontroller arasındaki genotip karşılaştırmaları için Ki-kare testi kullanılmıştır (Tablo 4.6).



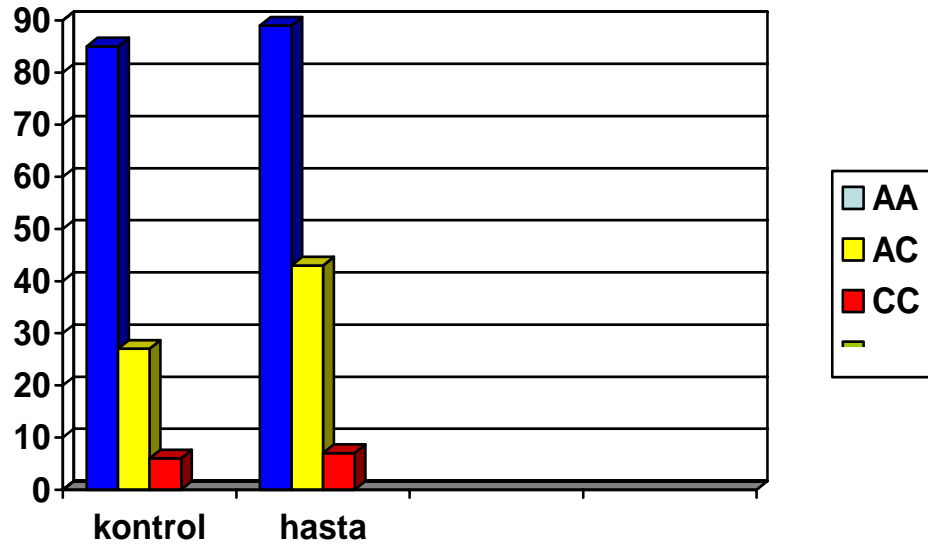
Şekil 4.5. Tüberkülozlu hastalarda P2X7 A1513C polimorfizminin RFLP-PCR sonuçları



Şekil 4.6. Sağlıklı kontrollerde P2X7 A1513C polimorfizminin kesim reaksiyonu sonucu

|           |              | Kontrol | Tüberküloz | P değeri   |
|-----------|--------------|---------|------------|------------|
| Pozisyon  | Genotip/alel | n(%)    | n(%)       | TÜBERKÜLOZ |
| —1513 A-C | AA           | 85 (72) | 66 (64)    | 0.27       |
|           | AC           | 27 (22) | 32 (31)    |            |
|           | CC           | 6 (5)   | 6 (5)      |            |

Tablo 4.5. P2X7 A1513C ye göre genotiplendirme yapılan hasta ve kontrollerin dağılımı



Çizelge 4.3. P2X7 A1513C polimorfizminin kesim reaksiyonu dağılımı

| A↔C   | AA↔AC  | AA+AC↔CC                                    | AA↔AC+CC                                    |
|---|--|---|---|
| p=0.249<br>Odds ratio=1,303<br>(0,83–2,04)  | p=0.145<br>Odds ratio=1,521<br>(0,864–2,678) | p=0.851<br>Odds ratio=1,114<br>(0,36–3,45)  | p=0.171<br>Odds ratio=1,447<br>(0,851–2,46) |
| C↔A   | CC↔AC  | CC+CA↔AA                                    | AA+AC↔CC                                    |
| p=0.249<br>Odds ratio=0,768<br>(0,49–1,204) | p=0.608<br>Odds ratio=1,365<br>(0,414–4,496) | p=0.851<br>Odds ratio=0,897<br>(0,29–2,779) | p=0.986<br>Odds ratio=1,01<br>(0,33–3,093)  |

Tablo 4.6. P2X7 A1513C polimorfizmi açısından yaptığımız çalışmanın *Hardy-Weinberg* dengesi (123)

## TARTIŞMA

Tüberküloz, tüm dünyada çok önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. TB olgularının %95' i ve TB'ye bağlı ölümlerin %97' si endemisi yüksek ülkelerde görülür. Buna rağmen Tüberküloz endüstriyel ülkelerde önemli bir problemdir (91).

Sitokin salınımindaki bireysel çeşitliliğe, genler içinde veya yakınındaki polimorfizmler sebep olduğu için IFN $\gamma$  geninin promoter bölgesinde lokalize olmuş SNP' lerin bu genin transkripsiyonel aktivitesini engelleyebildiğine yönelik kanıtlar var (92).

IFN $\gamma$  gen transkripsiyonunun regülasyonu kompleksdir ve proksimal promoter ile bir kaç transkripsiyon faktörü interaksiyona girer (93)

SLC11A1'in erken Makrofaj yanıtında önemli rol oynadığı, Reaktif oksijen mediyatörlerinin, Nitrik oksit sisteminin aktivasyonunda, IL-1 $\alpha$ , TNF-alfa gibi yangı uyarıcı sitokinlerin salınmasında rolü olduğunu gösteren yayınlar vardır (119-121)

SLC11A1 (NRAMP1) ve Tüberküloz bu genin farelerde TBC karşı dirençte önemli olduğu biliniyor. Bellamy R (122) Batı Afrikalılarda bu genin 4 polimorfizminin TBC' a yakınlıkla ilgili olduğunu yayınlamıştı.

Birimimizde SLC11A1 çalışması yapılmış ve Genotiplere göre *Mycobacterium Tuberculosis* antijenleri ESAT-6 ve CFP-10' a karşı IFN- $\gamma$  cevabı belirgin bir fark göstermemiştir. Özet olarak, verilerimiz SLC11A1 geni polimorfizmin TB' a yakınlıkla kuvvetli olmayan bir birliktelik gösterdiğini bu birlikte gidişin IFN- $\gamma$  yanıtıyla ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Daha önce birimizde Tüberkülozlu hastalarda gamma interferon + 874T/A polimorfizmi 'ne yönelik yapılan çalışmada, aktif TB hastalığı geçiren olgularla, aynı etnik ve coğrafik kökenden, aktif TB hastalığı ve TB hastalığı geçirme öyküsü olmayan kontrollerde IFN- $\gamma$  +874 T-A polimorfizmini araştırılmıştı. Bu çalışma sonunda interferon gamma +874 bölgesinde TT olmanın tüberküloza dirençle ilişkili olduğu bulunmuş ve bu bölgedeki polimorfizmin interferon yanıt düzeyini etkilediği gözlenmiştir. Ancak interferon gamma +874 T/A ile tüberküloz hastalığına yakınlık ilişkisi hastaların sadece küçük bir bölümünü açıklamaktadır. Bu gözlem TB hastalığına yakınlıkla ilgili bu gen içinde başka bölgelerin veya başka genlerdeki değişikliklerin de yakınlık veya dirençle ilgili olabileceğini düşündürmektedir(6)

Daha önce raporlanmış çalışmalardan, IFN $\gamma$  geninin promoter bölgesindeki iki polimorfizmi seçtik (4) ve çalışmamızda Türk toplumunda Tüberkülozlu hastalarda ve sağlıklı kontrollerde insan IFN $\gamma$  geninin bu iki promoter polimorfizmini araştırdık. Bu bölgeler IFN $\gamma$  promoter -155 ve -183 bölgeleriydi. Bu iki polimorfizm IFN $\gamma$  geninin transkripsiyonunu etkileyebilir.

IFN $\gamma$  promoterinin özü, Delesyon analiz çalışmaları ile tanımlanmıştı (94, 95). —30 ve -100 bölgeleri yüksek derecede korunmuş olduğu ve proteinlerle kompleks yapabilen iki alt bölge içerdiği, ayrıca proksimal alt bölgenin (-48 ‘ e-73 den) IL-2 promoterine güçlü homoloji gösterdiği çalışmalarda gösterildi (96). Transkripsiyonu aktive edici faktör-2 (ATF-2), c-Jun heterodimeri ve c-Jun homodimerlerini aktive ederek bu homolog elementlere (NF-IL2) bağlanarak IFN $\gamma$  transkripsiyonunun aktivasyonuna katılıyorlardı. Tersine, siklik AMP cevap elementi bağlanma proteini (CREB) NF-IL2’ ye bağlanarak bu transkripsiyonu inhibe eder. Distal alt bölgesi (-80 e -96 dan) Th1\Th2 farklılaşmasında kritik rol oynayan GATA-3 faktörüne bağlanır. Bununla birlikte, proksimal bölge, hücre tipleri arasında DNA bağlanma profilindeki farkları incelemek için bir araç olarak kullanılmıştı. Fare Th1 ve Th2 hücre sıralarından nükleer ekstreler kıyaslandığı zaman oluşan komplekslerde niteliksel farklar gözlenmişti. Bir miktar farklı kompleksler belirlenmesine rağmen belirli kompleksler Th1 nükleer ekstrelerinde ve diğerleride Th2 ekstrelerinde daha yaygındır (97). Bu sonuçlar gösteriyor ki Yardımcı T hücre farklılaşmasında bu bölge önemlidir. Böylece IFN $\gamma$  genindeki polimorfik bölgelerin varlığını araştırmak daha ilgi çekici oldu özellikle immün cevabın başlamasında bu sitokinin rolünün kritik olması düşündürücüdür.

Kaminuma ve ark. (98)’ larının yaptıkları bir çalışmada IFN $\gamma$  -183 G/T polimorfizminin fonksiyonel öneme sahip olduğunu gösteren kanıtlar var (98). STAT4 transkripsiyon faktörünün IFN $\gamma$  promoter aktivitesini arttırdığı fakat GATA-3 tarafından gen transkripsiyon düzeyinde downregüle edildiği raporlanmıştı. IFN $\gamma$  promoterındaki STAT4 ve GATA-3’ ün bu etkileri -172 ile -257 arasındaki bölgeleri çevreleyen bölgenin çıkarılma yoluyla kaybedildiği kanıtlandı (98).

Barbulescu ve ark. (99)’ nın yaptıkları bir çalışmada -183 ile -196 arasındaki bölgenin Transkripsiyonu aktive edici faktör-1 (AP-1) ‘in bağlanma bölgesi olduğu gösterilmiş (99). Bizim çalıştığımız -183 bu bölgenin içinde bulunmakta ve bu bölgede olabilecek bir nükleotid değişimi AP-1 domainine bağlanmayı ve T hücrelerinin promoter aktivitesini değiştirebilir ki buda IFN $\gamma$  geninin transkripsiyonunu ve üretimini etkileyebilir böylece patojenlere konak immün cevabını da değiştirebilir. Yine Barbulescu ve ark. nın yaptığı bu çalışmada IFN $\gamma$  gen promoter bölgesinin 155 bp upstreamında lokalize olmuş diğer polimorfizm T hücre bölgesini aktive eden nükleer faktör (NFAT bölgesi \_168 taaacgcgaaa-160 ) e yakındır ve bu bölgenin stabilitesini etkileyebilir(99).

Çalışmamızda IFN $\gamma$  promoter bölgesinde yani Transkripsiyonun başlamasından -183 pozisyonunda G den T ye ve -155 pozisyonunda A dan G ye değişim gösteren iki Tek Nükleotid değişimine Türk toplumundaki hastalarda baktık. Alellik frekansları -183 de 1 (G) ve 0 (T) ve -155 de 1 (A) ve 0 (G) olarak bulundu.

Antalya ve istanbuldan toplanan sırasıyla 82 ve 83 kişilik toplamda 165 TB hastalarının hepsinde -183 bölgeleri AvaII enzimi ile kesim yapıldığında tüm hepsinde 156 ve 175 bp’ lik iki bant görüldü. Tüm hastalar -183 G/G genotiplerine sahiptiler. Aynı şekilde 81 kontrol yine aynı promoter bölgesi için çalışıldığında tüm

kontrollerinde hastalarda olduğu gibi -183 G/G genotipine sahip oldukları amplifikasyon ürününün kesilerek 156 ve 175 bp'lik iki bant vermesi ile ortaya çıktı. Sudan popülasyonunda Chevillard ve ark. (4)'nin yaptığı çalışmada aynı bölge için 82 örneğin 70 tanesi -183 G/G ve 12 tanesinde -183 G/T genotiplerine sahip oldukları görülmüş. Aynı popülasyonda alelik frekanslarına bakılınca 0.927 (G) ve 0.073 (T) frekansları çıkmış (4). Chevillard ve ark. (4)'nin yaptıkları çalışmanın bizimkinden farkı onlarda 0.073 gibi çok düşük bir orandada olsa T alel frekansı toplumlarında rastlanılmış Türk toplumunda bu frekans bizim yaptığımız çalışmada 0 olarak bulundu. Hem Sudan hem Türk toplumunda -183 T/T genotipine sahip hiç bir bireye rastlanılmaması her iki çalışmanın ortak olan yanısıdır.

—155 Bölgesi AluI enzimi ile kesim yapıldığı zaman -155 A/A genotipli olan normal bireyler için 331 bp'lik tek bir bant ile kesim göstermeyecek, polimorfik olan -155 G/G genotipli bireylerde 147 ve 184 bp'lik iki bant verecektir. Heterozigot olan -155A/G genotipli bireylerin ise kesim reaksiyonları 331,147 ve 184 bp'lik üç bant verecektir. —155 promoter bölgesi içinde Antalya'dan 93, İstanbul'dan 95 hastayla toplamda 188 hasta çalışıldı. Hastaların hiç birinde kesim görülmedi. Tüm bireyler -155 A/A genotipine sahiptirler. Sudan popülasyonunda Chevillard ve ark. (4)'nin yaptığı çalışmada aynı bölge için 88 örneğin 84 tanesi -155 A/A ve 4 tanesinde -155 A/G genotiplerine sahip oldukları görülmüş. Aynı popülasyonda alelik frekanslarına bakılınca 0.977 (A) ve 0.023 (G) frekansları çıkmış(4). Chevillard ve ark. (4)'nin yaptıkları çalışmanın bizimkinden farkı onlarda 0.023 gibi çok düşük bir orandada olsa G alel frekansı toplumlarında rastlanılmış Türk toplumunda bu frekans bizim yaptığımız çalışmada 0 olarak bulundu. Hem Sudan hem Türk toplumunda -155 G/G genotipine sahip mutant alel taşıyan hiç bir bireye rastlanılmaması her iki çalışmanın ortak olan yanısıdır.

Bizim bu çalışmamız gösteriyor ki baktığımız IFN $\gamma$  promoter polimorfizmleri Türk toplumunda polimorfik değildir. Tabii ki -155A/G polimorfizmine yönelik AluI enzimi ile yaptığımız kesim reaksiyonu sonucu hiç kesim görülmemiş olması her ne kadar hasta ve sağlıklı bireyleri yabancı ırk olarak düşündürse de enzimin çalışmaması olma ihtimalini göz ardı edemeyiz.

Bu çalışmamızın ardından yine birçok çalışmada TB'e yatkınlıkta rolü olduğu bahsedilen P2X7 1513 A→C polimorfizmini TB'li hastalar ve sağlıklı kontrollerde çalıştık.

P2X7 reseptörleri büyük oranda makrofajlarda ekspresse edilmekte(76, 87). Katyon kanallarının açılıp Ca<sup>++</sup> girişine sebep olarak kaspas kaskadını aktive eder ve böylece apoptosise sebep olur (100, 101). P2X7 geni insanda yüksek derecede polimorfiktir ve bir kaç SNP'leri tanımlandı(102)

1513A→C, en yaygın olan polimorfizmdir ki bu polimorfizm P2X7 nin C terminalinde bulunan 496 pozisyonundaki Glutamik asitten alanin amino asidine değişime neden olur (87). Bu aminoasit değişimi birçok hücredeki katyon geçişini, makrofajlardan IL-1 $\beta$ , IL-18 ve Matrix Metalloproteinaz (MMP9) salınımını ve lenfositlerden CD62L ve CD23 ün oluşumunda içeren birçok P2X7 fonksiyonunu etkiler (87, 90, 103–107). Farklı çalışmalarda gösterilmiş ki homozigot C aleli (C/C)

bu bireylerde ATP uyarımı ile Mikobakteri ölümünü engelleyerek P2X7 fonksiyonlarının neredeyse tamamen kaybına yol açar (108–110).

P.Nino-Moreno ve ark.(111) Çalışmalarında P2X7 geninin 13.eksonunda Glu496Ala SNP' ni Akciğer TB li hastalarda belirgin olarak gösterdiler. Bu çalışma bu reseptörün bir genetik polimorfizminin Tüberküloz la ilişkisini gösteren ilk çalışmadır ve Bu polimorfizm Tüberküloza yatkınlığı artırır. Bu reseptör infeksiyonun patogeneğinde önemli rol oynar(111). P2X7 Glu497Ala mutasyonu bu kanalın fonksiyonunu etkilediği ve bu polimorfizm homozigot durumdayken P2x7 fonksiyonunun neredeyse tamaen kaybına yol açtığı daha önce tanımlanmıştı (90, 112). Gambian populasyonunda bu polimorfizmin TB ile ilişkisinin olmadığı bulunmuş(7)

Suran L. Fernando ve ark. (3)' nın yaptıkları çalışmada P2X7 A1513C polimorfizminin reseptör fonksiyon kaybına yol açtığı bulundu ve Akciğerdışı Tüberküloza yatkınlıkta rolü olabilir dendi (3)

Bizim çalışmamızda toplamda 139 Tüberküloz hastası ve 118 sağlıklı kontrol çalıştık ve sonuçta buradaki hastaların 89 tanesi 1513AA genotipinde 7 tanesi 1513CC genotipinde ve 43 tanesinde 1513AC genotipinde bulundu. P.Nino-Moreno ve ark (111)' nın yaptıkları çalışmada çıkan hasta frekansları bizim hastalarımızın frekansı oldukça yakındı. Kontrol grubumuzda 118 sağlıklı kontrolümüzün 85 tanesi 1513AA genotipinde, 6 tanesi 1513CC genotipine ve 27 tanesinde 1513AC genotipine sahip olarak bulundu. Yine P.Nino-Moreno ve ark. (111)' larının yaptıkları çalışmayla kıyaslarsak sağlıklı kontrollerde normal ve heterozigot bireylerin frekansı birbirlerine oldukça yakınken mutant 1513CC bireylerin sayısında üç kat fark dikkat çekiyordu. Hasta bireylerde ise daha önce yapılmış bu çalışma ile arasında belirgin bir fark yoktu. Çalışmamızın sonucu P2X7 genindeki Glu496Ala değişimine sebep olan A1513C polimorfizmine bizim toplumumuzda hem sağlıklı hemde Tüberküloz hastası olan bireylerde rastlanılmış fakat sağlıklı kontrollerdeki sonuçlarıyla TB hastalarının sonuçları birbirine çok yakın olduğu için bu polimorfizmin Tüberküloz hastalığına yatkınlık ya da direnç oluşturduğuna yönelik bir sonuca varamayız. Eğer bu polimorfizmle ilgili daha geniş bir tarama yapılabilirse sonuçların değişebileceği düşüncesindeyiz.

## SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. IFN $\gamma$  promoter -155 değişimi için birimizde yaptığımız çalışmada hasta ve kontrollerde hiç polimorfik bireye rastlamadık. Ve buradanda řu sonuca varabiliriz ki; IFN $\gamma$  promoter -155 A/G polimorfizmi bizim toplumumuzda bulunamamıştır. Ama yinede tartışma bölümünde belirttiğimiz gibi restriksiyon enziminin çalışmamış olma ihtimalini bu polimorfizm için göz ardı edemeyiz.
2. IFN $\gamma$  promoter -183 değişimi için birimizde yaptığımız çalışmada hasta ve kontrollerde -155 değişiminde olduğu gibi hiç polimorfik bireye rastlamadık ve böylece řu sonuca varabiliriz ki; IFN $\gamma$  promoter -183 G/T polimorfizmi açısından bizim toplumumuzda polimorfik birey bulunamamıştır.
3. P2X7 genindeki Glu496Ala değişimine sebep olan A1513C polimorfizmine bizim toplumumuzda hem sağlıklı hemde Tüberküloz hastası olan bireylerde rastlanılmış fakat sağlıklı kontrollerdeki sonuçlarıyla TB hastalarının sonuçları birbirine çok yakın olduğu için bu polimorfizmin Tüberküloz hastalığına yatkınlık ya da direnç oluşturduğuna yönelik bir sonuca varamayız. Eğer bu polimorfizmle ilgili daha geniş bir tarama yapılabilirse sonuçların değişebileceği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Organization, W.H., Global tuberculosis control. WHO report Geneva Switzerland, WHO/CDS/CPS/TB 99.259,1999.
2. Collins, H.L.S.H. Kaufmann, The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, 103: 1-9, 2001.
3. Fernando, S.L., B.M. Saunders, R. Sluyter, K.K. Skarratt, H. Goldberg, G.B. Marks, J.S. WileyW.J. Britton, A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 175: 360-6, 2007.
4. Chevillard, C., S. Henri, F. Stefani, D. ParzyA. Dessein, Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-g) promoter. *European Journal of Immunogenetics*, 29: 53-56, 2002.
5. Keane, J., S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. Schwieterman, J.N. SiegelM.M. Braun, Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 345: 1098-104, 2001.
6. Yeğin, O. Berber Z., Interferon-Gamma gene +874T-A polymorphism is associated with Tuberculosis and Gamma İnterferon response. *Tuberculosis* 2007 May;87:225-30
7. Li, C.M., S.J. Campbell, D.S. Kumararatne, R. Bellamy, C. Ruwende, K.P. McAdam, A.V. HillD.A. Lammas, Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis*, 186: 1458-62, 2002.
8. İlvan, A., Akciğer tüberkülozu. *Aktüel Tıp Dergisi*, 3: 27-35, 2002.
9. Özlü, T., Tüberküloz ders notları. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilimdalı, Trabzon, 2001.
10. Frieden, T.R., T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. WattC. Dye, Tuberculosis. *Lancet*, 362: 887-99, 2003.



11. van Crevel, R., T.H. OttenhoffJ.W. van der Meer, Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 15: 294-309, 2002.
12. Berrington, W.R.T.R. Hawn, Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev*, 219: 167-86, 2007.
13. Ellner, J.J., Immune dysregulation in human tuberculosis. *J Lab Clin Med*, 108: 142-9, 1986.
14. Nerlich, A.G., C.J. Haas, A. Zink, U. SzeimiesH.G. Hagedorn, Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*, 350: 1404, 1997.
15. Morell, V., Mummy settles TB antiquity debate. *Science*, 263: 1686-7, 1994.
16. Camcıoğlu, Y., Çocukluk Çağı Tüberkülozunda Tedavi *J Pediatr Inf* 1: 18-22 2007.
17. Kestelyn, P.G.E.T. Cunningham, Jr., HIV/AIDS and blindness. *Bull World Health Organ*, 79: 208-13, 2001.
18. Geneva, WHO. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. Communicable Diseases, World Health Organization,WHO/CDS/TB/2002.295.,2002
19. Geneva, W.H.O., Global Tuberculosis Control Surveillance, planning, financing. WHO Report. Geneva, World Health Organization.Report no. WHO/HTM/ TB/2007.376. , 2007.
20. Mehta, S.I.S. Gilada, Ocular tuberculosis in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Ocul Immunol Inflamm*, 13: 87-9, 2005.
21. Biswas, J., H.N. Madhavan, L. GopalS.S. Badrinath, Intraocular tuberculosis. Clinicopathologic study of five cases. *Retina*, 15: 461-8, 1995.
22. Kumararatne, D.S., Tuberculosis and immunodeficiency--of mice and men. *Clin Exp Immunol*, 107: 11-4, 1997.
23. Glatman-Freedman, A.A. Casadevall, Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 11: 514-32, 1998.

24. Davies, P., Tuberculosis and migration. *Eur Respir Mon*, 4: 68-87, 1997.
25. Ding, S., L. LiX. Zhu, Polymorphism of the interferon-gamma gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population. *Hum Immunol*, 69: 129-133, 2008.
26. Tabbara, K.F., Tuberculosis. *Curr Opin Ophthalmol*, 18: 493-501, 2007.
27. Kocabaş, A., Günümüzde Tüberküloz Sorunu. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolünde*. Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi: 3-32, 1991.
28. <http://medicineworld.org/images/blogs/mycobacterium-tuberculosis-299290.jpg>,
29. <http://www.answers.com/topic/mycobacterium-1?cat=health>,
30. Helm, C.J.G.N. Holland, Ocular tuberculosis. *Surv Ophthalmol*, 38: 229-56, 1993.
31. Pillai, S. T.J. Malone J.C. Abad, Orbital tuberculosis. *Ophthal Plast Reconstr Surg*, 11: 27-31, 1995.
32. Rathinam, S.R.E.T. Cunningham, Jr., Infectious causes of uveitis in the developing world. *Int Ophthalmol Clin*, 40: 137-52, 2000.
33. Donahue, H.C., Ophthalmologic experience in a tuberculosis sanatorium. *Am J Ophthalmol*, 64: 742-8, 1967.
34. Bouza, E., P. Merino, P. Munoz, C. Sanchez-Carrillo, J. Yanez C. Cortes, Ocular tuberculosis. A prospective study in a general hospital. *Medicine (Baltimore)*, 76: 53-61, 1997.
35. who, Global DOTS expansion plan progress in TB control in high- burden countries World Health Organization Who\Cds\Stb\2001.11,2001.
36. Harward, m.s., open society Institute review of Tuberculosis control programs in eastern and central Europe and the Former Soviet Union Boston 2001. 2001.
37. McNicholl, J.M., M.V. Downer, V. Udhayakumar, C.A. Alper D.L. Swerdlow, Host-pathogen interactions in emerging and re-emerging

infectious diseases: a genomic perspective of tuberculosis, malaria, human immunodeficiency virus infection, hepatitis B, and cholera. *Annu Rev Public Health*, 21: 15-46, 2000.

38. Keane, J., M.K. Balcewicz-Sablinska, H.G. Remold, G.L. Chupp, B.B. Meek, M.J. Fenton, H. Kornfeld, Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*, 65: 298-304, 1997.
39. Ganguly, N., P.H. Giang, C. Gupta, S.K. Basu, I. Siddiqui, D.M. Salunke, P. Sharma, *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunol Cell Biol*, 86: 98-106, 2008.
40. Senaldi, G., S. Yin, C.L. Shaklee, P.F. Piguet, T.W. Mak, T.R. Ulich, *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol*, 157: 5022-6, 1996.
41. Mori, T., MDR-TB-Its characteristics and control in Asia-pacific rim symposium in USJCMSP 10th international conference on emerging infectious diseases in the Pacific rim. *Tuberculosis (Edinb)* 2007.
42. Sakai, J., S. Matsuzawa, M. Usui, I. Yano, New diagnostic approach for ocular tuberculosis by ELISA using the cord factor as antigen. *Br J Ophthalmol*, 85: 130-3, 2001.
43. Lammas, D.A., C. Stober, C.J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam, D.S. Kumararatne, ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*, 7: 433-44, 1997.
44. Di Virgilio, F., The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today*, 16: 524-8, 1995.
45. Wirsing, B.  
<http://www.mpg.de/english/illustrationsDocumentation/documentation/pressReleases/2004/pressRelease20041008/genPDF.pdf> [cited].
46. [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects1999/tb/tbody.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/tb/tbody.html).
47. Kaufmann, S.H., Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med*, 6: 955-60, 2000.

48. <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis.html>,
49. Stewart, G., B. Robertson D. Young, Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* , 1: 97 - 105, 2003.
50. Deligezer, U., E.E. Akışık N. Dalay, The Application Of The Lightcycler Fluorescence Pcr In Polymorphism Analysis: Investigation Of The Mthfr C677T Polymorphism In Childhood And Adult Patients With Myeloid Leukemia *Türk Onkoloji Dergisi Cilt 19, Sayı 4, 2004*
51. Barnes, P.F.M.D. Cave, Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*, 349: 1149-56, 2003.
52. Narayanan, S., Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, 120: 233-47, 2004.
53. Casanova, J.L.L. Abel, Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*, 20: 581-620, 2002.
54. Cooke, G.S.A.V. Hill, Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*, 2: 967-77, 2001.
55. Comstock, G.W., Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis*, 117: 621-4, 1978.
56. Dorman, S.E., C. Picard, D. Lammas, K. Heyne, J.T. van Dissel, R. Baretto, S.D. Rosenzweig, M. Newport, M. Levin, J. Roesler, D. Kumararatne, J.L. Casanova S.M. Holland, Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet*, 364: 2113-21, 2004.
57. Greenwood, C.M., T.M. Fujiwara, L.J. Boothroyd, M.A. Miller, D. Frappier, E.A. Fanning, E. Schurr K. Morgan, Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet*, 67: 405-16, 2000.
58. Baghdadi, J.E., M. Orlova, A. Alter, B. Ranque, M. Chentoufi, F. Lazrak, M.I. Archane, J.L. Casanova, A. Benslimane, E. Schurr L. Abel, An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *J Exp Med*, 203: 1679-84, 2006.
59. Jamieson, S.E., E.N. Miller, G.F. Black, C.S. Peacock, H.J. Cordell, J.M. Howson, M.A. Shaw, D. Burgner, W. Xu, Z. Lins-Lainson, J.J. Shaw, F. Ramos, F. Silveira J.M. Blackwell, Evidence for a cluster of genes on

chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun*, 5: 46-57, 2004.

60. Bellamy, R., N. Beyers, K.P. McAdam, C. Ruwende, R. Gie, P. Samaai, D. Bester, M. Meyer, T. Corrah, M. Collin, D.R. Camidge, D. Wilkinson, E. Hoal-Van Helden, H.C. Whittle, W. Amos, P. van Helden A.V. Hill, Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 8005-9, 2000.
61. Cervino, A.C., S. Lakiss, O. Sow, R. Bellamy, N. Beyers, E. Hoal-van Helden, P. van Helden, K.P. McAdam A.V. Hill, Fine mapping of a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11-13 in African families. *Hum Mol Genet*, 11: 1599-603, 2002.
62. Barreiro, L.B., O. Neyrolles, C.L. Babb, L. Tailleux, H. Quach, K. McElreavey, P.D. Helden, E.G. Hoal, B. Gicquel L. Quintana-Murci, Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med*, 3: e20, 2006.
63. Flores-Villanueva, P.O., J.A. Ruiz-Morales, C.H. Song, L.M. Flores, E.K. Jo, M. Montano, P.F. Barnes, M. Selmán J. Granados, A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med*, 202: 1649-58, 2005.
64. Hernandez-Pando, R., M. Jeyanathan, G. Mengistu, D. Aguilar, H. Orozco, M. Harboe, G.A. Rook G. Bjune, Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*, 356: 2133-8, 2000.
65. Feng, C.G., M. Kaviratne, A.G. Rothfuchs, A. Cheever, S. Hieny, H.A. Young, T.A. Wynn A. Sher, NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 177: 7086-93, 2006.
66. Flynn, J.L.J. Chan, Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 19: 93-129, 2001.
67. Gray, P.W.D.V. Goeddel, Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298: 859-63, 1982.
68. Bureau, J.F., F. Bihl, M. Brahic D. Le Paslier, The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. *Genomics*, 28: 109-12, 1995.

69. Ritacco, PalominoLeão, TUBERCULOSIS 2007. 2007.
70. Ottenhoff, T.H., F.A. Verreck, M.A. HoeveE. van de Vosse, Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*, 85: 53-64, 2005.
71. Chapgier, A., S. Boisson-Dupuis, E. Jouanguy, G. Vogt, J. Feinberg, A. Prochnicka-Chalufour, A. Casrouge, K. Yang, C. Soudais, C. Fieschi, O.F. Santos, J. Bustamante, C. Picard, L. de Beaucoudrey, J.F. Emile, P.D. Arkwright, R.D. Schreiber, C. Rolinck-Werninghaus, A. Rosen-Wolff, K. Magdorf, J. RoeslerJ.L. Casanova, Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet*, 2: e131, 2006.
72. North, R.A., Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82: 1013-67, 2002.
73. Jacobson, K.A., M.F. JarvisM. Williams, Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*, 45: 4057-93, 2002.
74. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. NorthG. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272: 735-8, 1996.
75. Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R.A. NorthG. Buell, Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36: 1277-83, 1997.
76. Rassendren, F., G.N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R.A. NorthA. Surprenant, The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem*, 272: 5482-6, 1997.
77. King, B.A. Townsend-Nicholson, Nucleotide and nucleoside receptors *Tocris Reviews No. 23 2003*
78. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. PantherF. Di Virgilio, The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*, 176: 3877-83, 2006.
79. Cabrini, G., S. Falzoni, S.L. Forchap, P. Pellegatti, A. Balboni, P. Agostini, A. Cuneo, G. Castoldi, O.R. BaricordiF. Di Virgilio, A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol*, 175: 82-9, 2005.

80. Wiley, J.S., L.P. Dao-Ung, C. Li, A.N. Shemon, B.J. Gu, M.L. Smart, S.J. Fuller, J.A. Barden, S. Petrou, R. Sluyter, An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 278: 17108-13, 2003.
81. Denlinger, L.C., P.L. Fiset, J.A. Sommer, J.J. Watters, U. Prabhu, G.R. Dubyak, R.A. Proctor, P.J. Bertics, Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 167: 1871-6, 2001.
82. Kim, M., L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North, A. Surprenant, Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J*, 20: 6347-58, 2001.
83. Egan, T.M., D.S. Samways, Z. Li, Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch*, 452: 501-12, 2006.
84. Donnelly-Roberts, D.L., M.T. Namovic, C.R. Faltynek, M.F. Jarvis, Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 308: 1053-61, 2004.
85. Faria, R.X., F.P. Defarias, L.A. Alves, Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C260-71, 2005.
86. Pelegrin, P.A. Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J*, 25: 5071-82, 2006.
87. Gu, B.J., W. Zhang, R.A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J.A. Barden, J.S. Wiley, A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, 276: 11135-42, 2001.
88. Fernando, S.L., B.M. Saunders, R. Sluyter, K.K. Skarratt, J.S. Wiley, W.J. Britton, Gene dosage determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages. *J Infect Dis*, 192: 149-55, 2005.
89. Shemon, A.N., R. Sluyter, S.L. Fernando, A.L. Clarke, L.P. Dao-Ung, K.K. Skarratt, B.M. Saunders, K.S. Tan, B.J. Gu, S.J. Fuller, W.J. Britton, S. Petrou, J.S. Wiley, A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and

impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem*, 281: 2079-86, 2006.

90. Saunders, B.M., S.L. Fernando, R. Sluyter, W.J. Britton, J.S. Wiley, A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *J Immunol*, 171: 5442-6, 2003.
91. Broekmans, J.F., G.B. Migliori, H.L. Rieder, J. Lees, P. Ruutu, R. Loddenkemper, M.C. Raviglione, European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group. *Eur Respir J*, 19: 765-75, 2002.
92. Bream, J.H., A. Ping, X. Zhang, C. Winkler, H.A. Young, A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes Immun*, 3: 165-9, 2002.
93. Kojima, H., Y. Aizawa, Y. Yanai, K. Nagaoka, M. Takeuchi, T. Ohta, H. Ikegami, M. Ikeda, M. Kurimoto, An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. *J Immunol*, 162: 5063-9, 1999.
94. Chrivia, J.C., T. Wedrychowicz, H.A. Young, K.J. Hardy, A model of human cytokine regulation based on transfection of gamma interferon gene fragments directly into isolated peripheral blood T lymphocytes. *J Exp Med*, 172: 661-4, 1990.
95. Penix, L., W.M. Weaver, Y. Pang, H.A. Young, C.B. Wilson, Two essential regulatory elements in the human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells. *J Exp Med*, 178: 1483-96, 1993.
96. Penix, L.A., M.T. Sweetser, W.M. Weaver, J.P. Hoeffler, T.K. Kerppola, C.B. Wilson, The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem*, 271: 31964-72, 1996.
97. Young, H.A., P.A. Ghost, J. Ye, J. Lederer, A. Lichtman, J.R. Gerrard, L. Penix, C.B. Wilson, A.J. Melvin, M.E. McGurn, Differentiation of the helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-gamma gene. *Journal of the Immunology*, 15: 3603, 1994.
98. Kaminuma, O., F. Kitamura, N. Kitamura, M. Miyagishi, K. Taira, K. Yamamoto, O. Miura, S. Miyatake, GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter



activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Lett*, 570: 63-8, 2004.

99. Barbulescu, K., K.H. Meyer zum BuschenfeldeM.F. Neurath, Constitutive and inducible protein/DNA interactions of the interferon-gamma promoter in vivo in [corrected] CD45RA and CD45R0 T helper subsets. *Eur J Immunol*, 27: 1098-107, 1997.
100. Wiley, J.S., C.E. Gargett, W. Zhang, M.B. SnookG.P. Jamieson, Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel. *Am J Physiol*, 275: C1224-31, 1998.
101. Humphreys, B.D., J. Rice, S.B. KertesyG.R. Dubyak, Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem*, 275: 26792-8, 2000.
102. Boldt, W., M. Klapperstuck, C. Buttner, S. Sadtler, G. SchmalzingF. Markwardt, Glu496Ala polymorphism of human P2X7 receptor does not affect its electrophysiological phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C749-56, 2003.
103. Sluyter, R., J.G. DalitzJ.S. Wiley, P2X7 receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes Immun*, 5: 588-91, 2004.
104. Sluyter, R., A.N. ShemonJ.S. Wiley, Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *J Immunol*, 172: 3399-405, 2004.
105. Georgiou, J.G., K.K. Skarratt, S.J. Fuller, C.J. Martin, R.I. Christopherson, J.S. WileyR. Sluyter, Human epidermal and monocyte-derived langerhans cells express functional P2X receptors. *J Invest Dermatol*, 125: 482-90, 2005.
106. Sluyter, R.J.S. Wiley, Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol*, 14: 1415-21, 2002.
107. Gu, B.J.J.S. Wiley, Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood*, 107: 4946-53, 2006.
108. Bai, J., G.B. Marks, G.J. Stewart, S.E. SimpsonE.A. Sullivan, Specificity of notification for tuberculosis among screened refugees in NSW. *Aust N Z J Public Health*, 23: 410-3, 1999.

109. Hoal-Van Helden, E.G., J. Epstein, T.C. Victor, D. Hon, L.A. Lewis, N. Beyers, D. Zurakowski, A.B. Ezekowitz P.D. Van Helden, Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatr Res*, 45: 459-64, 1999.
110. Kim, J.H., S.Y. Lee, S.H. Lee, C. Sin, J.J. Shim, K.H. In, S.H. Yoo K.H. Kang, NRAMP1 genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculous pleurisy. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7: 370-5, 2003.
111. Nino-Moreno, P., D. Portales-Perez, B. Hernandez-Castro, L. Portales-Cervantes, V. Flores-Meraz, L. Baranda, A. Gomez-Gomez, V. Acuna-Alonzo, J. Granados R. Gonzalez-Amaro, P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 148: 469-77, 2007.
112. Kusner, D.J.J. Adams, ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol*, 164: 379-88, 2000.
113. Perussia, B., Dayton, E. T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J., Trinchieri, G. (1983) Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J. Exp. Med.* **158**, 2058–2080.
114. Young, H. A., Hardy, K. J. (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 373–381.
115. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–795.
116. Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999) Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* **163**, 4647–4650.
117. Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R., Coffman, R. L. (1988) IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* **140**, 1022–1027.
118. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions *Journal of Leukocyte Biology* 75, 163–189
119. Govoni G., Vidal S., Gauthier S., Skamene E., Malo D., Gros P., The Bcg/Ity/Lsh locus: Genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 Allele, *Infect. Immun.* 64 (1996) 2923–2929.

120. Howard C.H., Whitehead S.H., Blackwell J.M., Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects of macrophage activation: Influence on oxidative burst and nitric oxide pathways, *Mol.Med.* 1 (1995) 267–279.
121. Roach T.I.A., Kiderlen A.F., Blackwell J.M., Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* and amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains, *Infect. Immun.* 59 (1991) 3935–3944.
122. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, Mc Adam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. 1998 *NEJM* 338:640
123. <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.p1>

## ÖZGEÇMİŞ

Esmâ KONUK, 1977 yılında Antalya’ da doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Anatalya’ da tamamladı. 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 1999 yılında aldı ve 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD İmmünoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. 1999–2005 yılları arasında 6 yıl boyunca özel sektörde çalıştı ve bu arada Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek lisansını tamamladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD’da Sağlık Teknisyeni olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir. Yabancı dili İngilizce’dir.