

**BİR TÜRK POPULASYONUNDA KIRIM
KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI
İLE *TOLL BENZERİ RESEPTÖR 10*
GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI
SİBEL KIZILDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI
2011**

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİR TÜRK POPULASYONUNDA KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ
HASTALIĞI İLE *TOLL BENZERİ RESEPTÖR 10* GEN POLİMORFİZMİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SİBEL KIZILDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİMDALİ**

2011

Danışman: Yrd. Doç.Dr. SERDAL ARSLAN

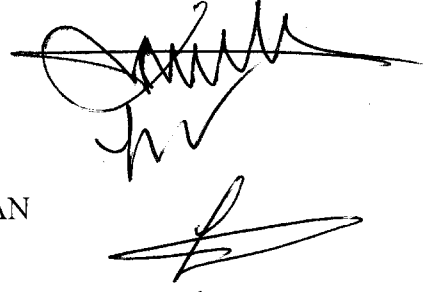
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan.. Prof. Dr. Naci DEĞERLİ

Üye ...Doç Dr. Yavuz SİLİĞ

ÜyeYrd. Doç Dr. Serdal ARSLAN

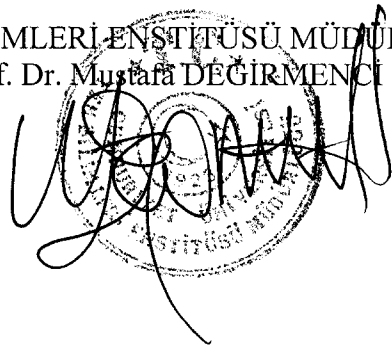


ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

29/06/2011

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ
Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCI



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünce hazırlanan ve yayınlanan “Yüksek Lisans ve Doktora tez yazım Kılavuzu” adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ	1
1.1-Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Genel Özellikleri	1
1.1.1-Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Tarihçesi	1
1.1.2-KKKA Virüsün Sınıflandırılması	1
1.1.3- KKKA Virüsün Moleküler Yapısı ve Viral Yaşam Döngüsü.....	2
1.1.4- Virüs Proteinlerinin Genel Özellikleri	4
1.2- Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Türkiyede ve Dünyadaki Dağılımı.....	9
1.3- Bağışıklık Sistemi ve Toll Benzeri Reseptörler	11
1.3.1- İnsan Toll Benzeri Reseptörleri	13
1.3.2- Toll Benzeri Reseptörlerin Temel Yapısı	13
1.3.3- Toll Benzeri Reseptörlerde Ligand Tanımanın Moleküler Mekanizması	15
1.3.4- Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Mekanizması.....	16
1.3.5- Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Mekanizmasında Kullanılan proteinler	17
1.3.6- İnsan Toll Benzeri Reseptör 10 (hTLR10) Stoplazmik Motifin Kristal Yapısı Bir Sinyal Dimerin Açıklanması	26
1.3.6.1- İnsan Toll Benzeri Reseptör 10'un Toll / Interleukin 1 reseptör (TIR) motifi;	28
2- MATERYAL METOD	34
2.1-Örneklerin Toplanması ve Saklanması:	34
2.2. DNA izolasyonu:	34
2.3.Genomik DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	35
2.4- Agaroz Jel Elektroforezi	35

2.5- PZR Amplifikasyonu	35
2.6- RFLP Reaksiyonu	36
2.7- Sekans Analizi	37
2.8- İstatistiksel Analizler	39
4- TARTIŞMA SONUÇ	48
6- ÖZGEÇMİŞ	71
7- EKLER	72
ETİK KURULU KARARI	75

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bir Türk Populasyonunda Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı ile *Toll Benzeri Reseptör 10* Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Sibel KIZILDAĞ

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Serdal ARSLAN

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) kene üzerinde taşınan bir Nairovirüs olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün neden olduğu ve aniden başlayan yüksek ateş, şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, sırt ve karın ağrısıyla karakterize bir hastalıktır. Toll benzeri reseptörler (TLR) sonradan kazanılan ve doğuştan gelen bağışıklıkta önemli rol oynayan bağışıklık hücrelerinin tipl transmebran proteinleridir. Bu çalışmada ilk defa bir Türk populasyonunda PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)-RFLP (restiriksion fragment uzunluk polimorfizmi) yöntemi kullanılarak *TLR 10* gen polimorfizmi ve KKKA arasındaki ilişki araştırılmıştır.

TLR10 2322 A/G polimorfizmi için A alel frekansı kontrol grubunda %71,4 ve hasta grubunda %77,2 dir. KKKA hasta ve kontrol bireyler arasında alel frekansı dağılımlarında istatistiksel olarak bir farklılık yoktur ($p=0.153$). *TLR10* 720 A/C polimorfizminde ise A aleli hasta grubunda %64.2 ve kontrol grubunda %52.3'dür. KKKA hastalarında *TLR10* 720 A/C polimorfizminde alel A frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p=0.010$). KKKA hasta ve kontrol arasında AA genotipi ile CC ve AC+CC genotipleri frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel önemli olduğu belirlendi (CC için $p=0,006$, AC+CC için $p=0,048$). *TLR10* 992 T/A polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: TLR10, KKKA, RFLP, İnsan, Polimorfizm.

SUMMARY

MSc Thesis

**Investigation of Relationship Between Crimean Congo Haemorrhagic Fever and
Toll Like Receptor 10 gene polymorphism in a Turkish Population**

Sibel KIZILDAĞ

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences,

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serdal ARSLAN

Crimean–Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne disease caused by the arbovirus Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) and characterized by a sudden onset of high fever, severe headache, dizziness, back, and abdominal pains. Toll-like receptors (TLRs) are type1 transmembrane proteins of immune cells that play a critical role in innate and adaptive immunity. The present study first time aims to investigate the relation between *TLR 10* gene polymorphisms and CCHF by using PCR (polymerase chain reaction)-RFLP (restriction fragment length polymorphism) assay in a Turkish population.

The 2322 A/G polymorphism, A allele frequency was 77.2 % in CCHF patients and 71.4 % in healthy controls. There was not a significant difference in 2322 A/G genotype distribution between CCHF patients and control populations ($p = 0.153$). The 720 A/C polymorphism, A allele frequency was 64.2 % in CCHF patients and 52.3 % in healthy controls. A allele frequency in *TLR10* 720 A/C polymorphism of CCHF patients than the control group was determined to be statistically significant ($p = 0,010$). Comparison of AA genotype with CC and AC plus CC genotypes frequencies revealed that the difference between CCHF patients and controls was statistically significant ($p = 0,006$ for CC, $p = 0,048$ for AC + CC). *TLR10* for 992 T/A polymorphism was found statistically significant relationships between patient and control groups.

Key Words: TLR10, CCHF, RFLP, Human, Polymorphism

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bilgi ve birikimi ile her zaman yanımda olan, her türlü desteği veren danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Serdal ARSLAN’a teşekkür ederim.

Ayrıca kan örneklerinin temin edilmesinde her türlü desteği veren Sayın Yrd.Doç.Dr. Aynur ENGİN hocama teşekkür ederim.

Tezimi hazırlarken teknik konularda emeğini esirgemeyen Sevgili Kardeşim Ali’ye teşekkür ederim.

Sibel KIZILDAĞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1- Bir Bunyaviridae Virionunun şematik kesiti.	3
Şekil 2- Bunyaviridae ailesindeki virüslerin replikasyon siklusu.	4
Şekil 3- KKKAV L RNA Segmentinde kodlanan proteinlerin temsili sekans motifleri	5
Şekil 4- KKKA Virüsünün öncül glikoprotein şematik görünümü.	6
Şekil 5- KKKA Virüs olgun glikoprotein oluşumu günümüz modeli.	8
Şekil 6- KKKA'nın dünyada coğrafi dağılımı.	11
Şekil 7- TLR Yapısının şematik görünümü.....	14
Şekil 8- MyD88 kompleksinin yapısı.....	19
Şekil 9- İnsan MyD88 TIR motifi.	20
Şekil 10- TLR Yolağı.	22
Şekil 11- Hücre içi sinyal reseptörü.	25
Şekil 12. Kromozom 4 üzerinde TLR 10 Lokalizasyonu (4p-14).....	27
Şekil 13- İnsana ait farklı doku (A) ve hücre hatlarında (B) TLR10 ifadesi.	28
Şekil 14- TLR10 TIR Dimer Yapısı.	29
Şekil 15- İnsan TLR (hTLR) ailesi üyeleri arasındaki Evrimsel İlişki.....	32
Şekil 16- <i>TLR10</i> 2322 A/G polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü.	41
Şekil 17- <i>TLR10</i> 720 A/C polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü.	41
Şekil 18- <i>TLR10</i> 992 T/A polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü.	42

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1- Türkiye’de görülen KKKA olgu ve ölüm sayıları (Sağlık Bakanlığı 2010)	10
Tablo 2- İnsanda TLR'lerin patojenlerde tanıdıkları bazı tanımlanan patojen ilişkili moleküller...	13
Tablo 3- TLR10 SNP'lerine ait primerler, bağlanma sıcaklıkları ve restriksiyon enzimleri.....	43
Tablo 4. Hasta ve Kontrol popülasyonlarına ait demografik bilgiler	40
Tablo 5. Hasta ve Kontrol popülasyonlarında TLR10 Polimorfizmi için alel frekansı dağılımları	42
Tablo 6. Hasta ve Kontrol popülasyonlarında TLR10 polimorfizmi için genotip frekansı dağılımları	43
Tablo 7. Hasta ve Kontrol popülasyonları TLR10 Polimorfizmi için genotip frekansı ve risk değerleri	44
Tablo 8. Erkek Hasta ve Kontrol popülasyonlarında TLR10 genotipleri arasındaki risk değerleri	46
Tablo 9- Kadın Hasta ve Kontrol popülasyonlarında TLR10 genotipleri arasındaki risk değerler	47
Tablo10- Farklı popülasyonlarda tespit edilen TLR10 Gen polimorfizminin alel ve genotip sıklıklarının dağılımı ve Türk Popülasyonuna ait sonuçlarla karşılaştırılması	52

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
KKKA	Kırım Kongo Kanamlı Ateşi
LRR	Lösince Zengin Tekrarlar
MyD88	Myeloid kökenli farklılaşmış protein
MAPK	Mitojen aktif eden protein kinaz
NF-κB	Nükleer faktör kappa
OTU	Yumurtalık tümörü benzeri proteaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon (kesim) parçası uzunluk polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
STE	Sodyum tris EDTA
TBE	Tris borat EDTA
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TIR	Toll/IL-1 Reseptör

1.GİRİŞ

1.1-Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Genel Özellikleri

1.1.1-Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Tarihçesi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığı tarihte ilk defa 12. yy' da bugünkü Tacikistan bölgesinde görülmüştür. Hastalık normalde karatavuklara parazitlenen bir kene tarafından oluşturulan, insanlarda idrarda, rektumda, dişetlerinde ve karın boşluğunda kanamalara yol açan hemorajik bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Ayrıca bu hastalık Özbekistan'da yüzyıllardır değişik adlarla bilinmektedir. Özbekistan'ın güneyinde yaşayan yerli halk tarafından kan alma, burun kanaması ya da kara ölüm olarak adlandırılmıştır (Chumakov., 1974; Hoogsrtamino asitl., 1979). Orta Asya'da yüzyıllar boyunca akut enfarktüs kapillarotoksikozis, akut enfarktüs (atardamarın pıhtı ile tıkanması) hemoraji hastalığı ve Özbekistan Kanamalı Ateşi gibi KKKA 'ya benzeyen birçok hastalık görülmüştür (Chumakov.,1976). Bu kanamalı ateş, 1960 lı yılların ortalarına kadar iki ayrı virüs tarafından oluşturulan Kırım Kanamalı Ateşi ve Kongo Kanamalı Ateşi olarak iki ayrı hastalık olarak düşünülmekteydi. Kırım Kanamalı Ateşi ilk kez 1944-1945 yıllarında Kırım'da çiftçilere yardım eden 200 kadar Sovyet askerinde görülmesiyle modern tıbbın ilgisini çekmiş ve bu tarihlerde klinik vaka olarak değerlendirilmiştir.

Chumakov ve Ark. (1967), Moskova'daki Poliomyelitis ve Viral Ensafalitler Enstitüsünde enfekte hastalardan alınan kanın yeni doğmuş farelere intraserebral inokülasyonu sonucunda ilk kez virüs izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu metotla bir hastadan izole edilen Draslov suşu Rusya ve diğer ülkelerdeki deneysel çalışmalar için prototip suş haline gelmiştir. Kırım Kanamalı Ateşi virüsü, 1956 yılında Belçika Kongo'sunda (Zaire) ateşli bir hastadan izole edilen Kongo virüsüyle antijenik olarak benzer olduğu tespit edildi. Böylece Avrasya, Asya ve Afrika suşlarının ortak antijenik yapısı Kırım Kanamalı Ateşi-Kongo ve daha sonra Kırım Kongo Kanamalı Ateşi adını aldı.

1.1.2-KKKA Virüsün Sınıflandırılması

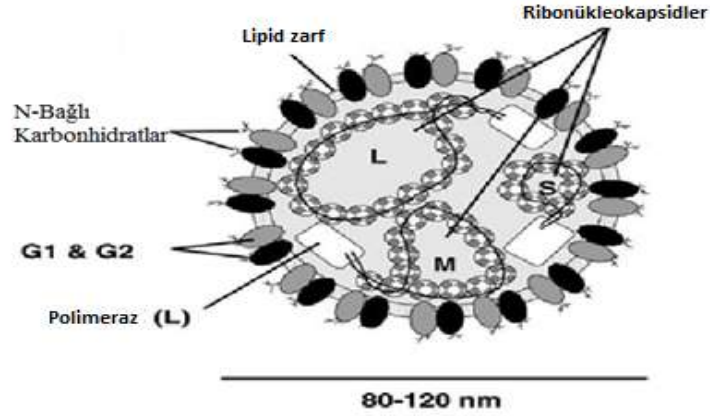
KKKA virüsü Bunyaviridae familyasının Nairovirus genusunda yer alır. Nairovirus genusunun içerdiği 34 viral suşda 7 türün varlığı kabul edilmiştir.

KKKA virüsü çoğunlukla Ixodid (sert kene) ya da Argas (yumuşak kene) kenelerinden geçtiği tespit edilmiştir (Burt ve Ark.,1996). Nairovirus genusunda kendi içinde birkaç serogruba ayrılır. Bu serogruplar, KKKA virüsü ve Hazara virüsleri içeren KKKA grubu ve Nairobi Koyun Hastalığı (NSD) virüsü ve Dugbe virüsünü içeren NSD gruplarıdır (Burt ve Ark.,1996). Dikkat çekici bir şekilde KKKA Virüsü hayvanlarda enfeksiyon oluşturmamasına rağmen, insanlarda %10-50 arasında ölümle sonuçlanan hastalık sendromları oluşturur. KKKA Virüsünün tersine NSD Virüsü ise koyun ve keçilerin bir enfeksiyonu olup insanlarda enfeksiyon oluşturmaz.

1.1.3- KKKA Virüsün Moleküler Yapısı ve Viral Yaşam Döngüsü

KKKAV'nin temel morfolojisi üzerine birkaç çalışma yapılmıştır (Murphy, 1968; 1973). KKKA Virüsü morfolojisinin ilk tanımlanması yeni doğmuş farenin enfekte beyininden elde edilen virüsle ilk defa tanımlanmış ve Bunyaviridae familyası üyelerine benzer olduğu düşünülmüştür. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar KKKA Virüsü temel morfolojisi, morfogenesizi, replikasyon siklusu ve fizikokimyasal özellikleri bakımından Bunyaviridae familyasının tipik üyelerinden birisi olduğu tespit edilmiştir (Donets, 1977; Ellis, 1981).

Bunyaviridae virüslerinin morfolojik yapıları (yapısal bileşenleri) çoğu diğer kılıflı virüslere benzerdir (Şekil 1). Virüsün tamamı yaklaşık 80-120 nm çapında ve sferik görünümündedir. Glikoprotein çıkıntıları içeren bir lipid zarfın altında viral genomun ve buna bağlı proteinlerin (nükleoproteinler ve polimeraz) saklandığı kapsid adı verilen çekirdek bulunur. Bunyaviridae ailesinin diğer üyeleri gibi KKKA Virüsü de üç yapısal proteine sahiptir. Bunlardan iki tanesi zar glikoproteinleridir ve Gn ve Gc olarak adlandırılır. Diğeri ise nükleokapsid proteindir ve N olarak gösterilir (Şekil1).

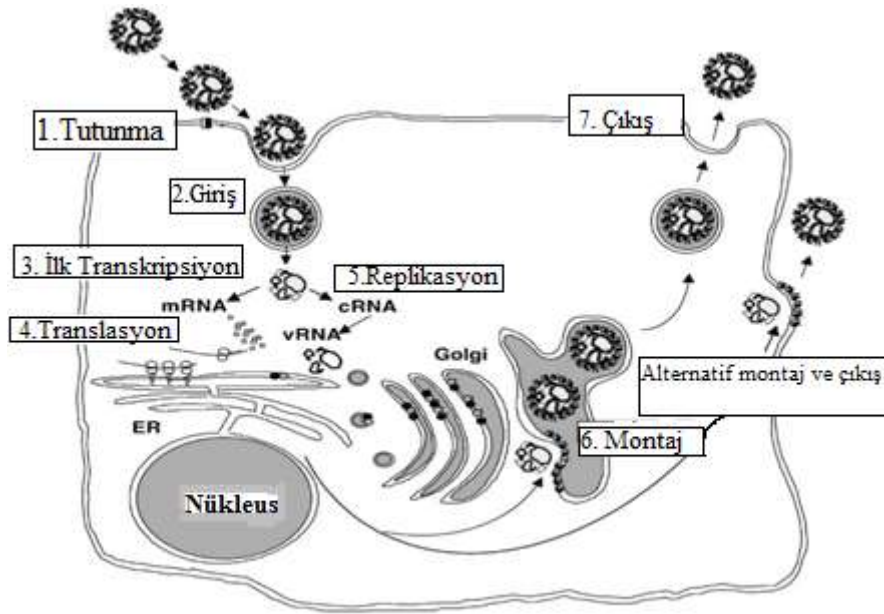


Şekil 1- Bir Bunyaviridae Virionunun şematik kesiti.

Üç adet RNA genom segmenti (L, M ve S) ribonükleokapsid yapısı oluşturmak amacıyla nükleokapsid proteini ile birlikte paketlenmişlerdir. Nükleokapsid ve RNA ya bağlı RNA polimerazda (Gn ve Gc olarak da bilinen) G₁ ve G₂ glikoproteinler içeren bir lipid zarf içinde paketlenmişlerdir.

KKKA Virüsü, çoğunlukla küresel yapıda (100nm çapında) zarflı, negatif polariteli, tek sarmallı RNA virüsleridir. Üç segmentden oluşan viral genom dört yapısal proteini kodlamaktadır. Her bir RNA segmenti ile birlikte kendisine bağımlı virüse ait RNA'ya bağımlı RNA polimeraz da paketlenmiştir. L proteini (RNA bağımlı RNA polimeraz) L (büyük) segmenti, Gn ve Gc glikoproteinleri M (orta) segmenti ve N nükleokapsid proteini ise S (küçük) segmenti tarafından sentezlenmektedir (Flick ve Ark., 2003). Viral glikoproteinler Gn ve Gc'lerin işlevi, konakta duyarlı hücrelerdeki reseptör bölgelerin tanınmasını sağlar. Virüs, duyarlı olduğu hücreye yapıştıktan sonra endositozla vezikül içerisinde hücre içine alınır. Replikasyon sitoplazmada gerçekleşir. Vezikül içindeki ortamın asitleşmesi ile glikoproteinlerin üç boyutlu yapısında değişiklikler ortaya çıkar ve virüsle vezikül membranının füzyonu gerçekleşir. Daha sonra nükleokapsid sitoplazmaya serbestlenir. Nairovirüsler negatif polariteli kodlama sistemine sahiptirler. Bu nedenle Viral RNA polimeraz çıplak haldeki RNA'yı kalıp olarak kullanamaz. RNA polimeraz konak hücre mRNA'larını kullanarak negatif polariteli viral genlerin mRNA'sını sentezletir. Bu mRNA'lardan ilgili proteinler oluşur. Transkripsiyonun ardından replikasyon için tam uzunlukta tamamlayıcı RNA'lar sentezlenir. Tamamlayıcı RNA'lar kalıp olarak kullanılıp genomik

RNA'lar oluşturulur. İkincil mRNA'lar proteinlere dönüştürülür. M segmenti tarafından kodlanan glikoproteinlerin translasyonu sonucunda Gc ve Gn 'nin öncülleri oluşturulur. Öncül glikoproteinler konak proteazlarıyla işlendikten sonra oluşan olgun glikoproteinler, golgi aygıtı içinde toplanır ve virüs montajı gerçekleşir. Golgiden tomurcuklanma yoluyla hücre içine geçerek oluşan virionlar veziküller içinde hücre yüzeyine taşınıp serbest hale gelirler (Donets, 1977; Ellis, 1981) (Şekil 2).



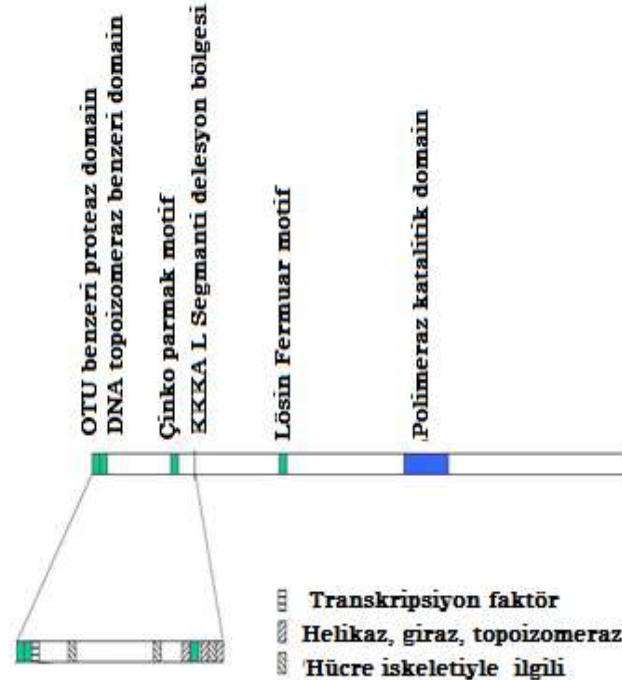
Şekil 2- Bunyaviridae ailesindeki virüslerin replikasyon siklusunu.

Viral glikoproteinler, duyarlı hücrelerdeki reseptör bölgelerin tanınmasından sorumludur. Virüs tutunmasından sonra virüsler endositoz yoluyla hücre içine alınır. Replikasyon stoplazma da gerçekleşir. Nükleokapsid proteini ile viralRNA bir araya gelir ve viral ribonükleopartikül Golgiye gider. Golgide glikoproteinlerle birleşir. Virionlar Golgi bölgesinde ER'dan tomurcuklanarak olgun hal alırlar. Stoplazmik veziküllerle hücre membranına ulaşır. Hücre membranından tomurcuklanma ve zarlanarak hücre dışına çıkar ya da Golgi cisimciğinde zarlanma ve eksotisoz yoluyla hücre dışına çıkar.

1.1.4- Virüs Proteinlerinin Genel Özellikleri

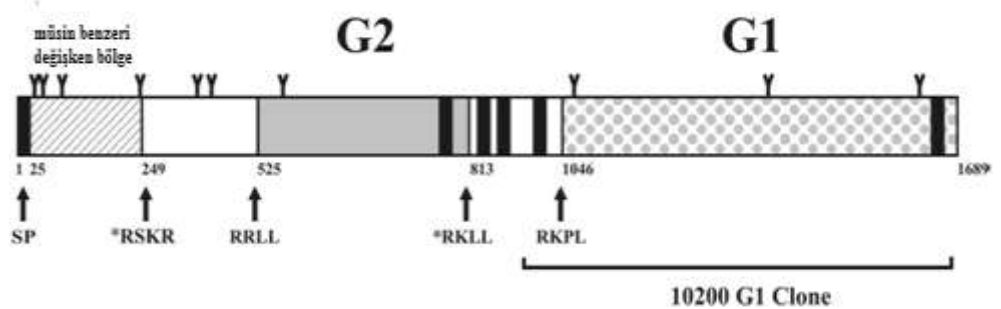
KKKA Virüs proteinlerinin moleküler karakterizasyonu üzerine son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır (Sanchez ve Ark., 2002). KKKA Virüsünün RNA genomundaki 3 segment; viral nükleokapsid, membran ilişkili glikoprotein öncülü (preGn ve preGc) ve RNA bağımlı RNA polimeraz şeklinde dört protein kodlar. S RNA segmenti tarafından kodlanan N proteini

nükleokapsidin major komponentidir. L RNA segmenti ise 12164 bç'ne sahiptir ve yaklaşık 4000 amino asitten oluşan RNA bağımlı RNA polimeraz kodlar. 5' kodlama yapmayan bölge 76bç ve 3' kodlama yapmayan bölge 253bç uzunluğundadır. L RNA segmenti açık okuma çerçevesi 3944 amino asit ve 448 kDa ağırlığında protein kodlar. L proteinlerinin amino ucu 750 amino asit diziler ve proteinler, nükleikasit etkileşimleri (helikaz, giraz, topoizomeraz proteinler ve transkripsiyon faktörleri) ve hücre iskeleti ile ilişkili proteinler içeren bir bölgeye sahiptir (Morikawa ve Ark., 2007). Bu bölge C2H2 tip çinko parmak motif ve lösün fermuar motife sahiptir. KKKAV L segmentindeki bir dizi yüksek oranda ökaryotik DNA topoizomeraz I aktive eden bölge motifine benzemektedir. L proteininde yumurtalık tümörü (OTU) benzeri proteazlar, poliprotein otoproteolitik bölünmesi ile polimeraz ve helikaz oluşmasında görevlidir (Bergeron ve Ark., 2010) (Şekil 3).



Şekil 3- KKKAV L RNA Segmentinde kodlanan proteinlerin temsili sekans motifleri

M RNA segmentinin kodladığı öncül glikoprotein büyük bir poliproteindir ve inaktif öncüller halinde sentezlenir. Sonra konak hücre proteazları tarafından bölünerek aktif protein halini alır. Zarflı virüslerde proteolitik ayırım virüsün biyolojik karakterini ayarlar. Çoğu virüs glikoproteinleri hücresel furin ya da furin benzeri proteazların substratıdır. Örneğin bir viral proteindeki R-X-(K/R)-R motif yapısı furin aktivasyonu için uygun substratı oluşturur. Kanamalı ateş virüsleri arasında Ebola ve Marburg virüslerin glikoproteinleri furin ya da furin benzeri proteazlarla ayrılır. Aksine KKKA Virüsü ve Arena Virüsleri öncül glikoproteinleri “subtilisin kexin isoenzim/ site -1 proteaz” (SKI-S1P) tarafından ayrılır. SKI-S1P, furin proteazların tanıdığı temel kalıntılar yerine hidrofobik kalıntıları tanır. Bunlar RRLL, RKPL, RSKR ve RKLL tetrapeptidlerdir (Şekil 4). Bu bölgeler KKKA Virüsünün tüm suşları arasında korunmuştur. Bu virüs glikoproteinleri omurgalıları ya da kene-konak kullanımını, virüsün hücre tropizmini ve insanı enfekte süresince virüs patogenezi yüksek seviyede etkiler. KKKA Virüsünde kodlanmış poliprotein amino ucu, yüksek seviyede korunmuş müsin benzeri değişken bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu özellik Bunyaviridae ailesinin üyeleri arasında yalnızca Nairovirüslere ait bir özelliktir. Şekil 4’te Y şeklinde gösterilen kısımlar 10 tane N-bağlantılı glikalizasyon bölgeleridir.



Şekil 4- KKKA Virüsünün öncül glikoprotein şematik görünümü.

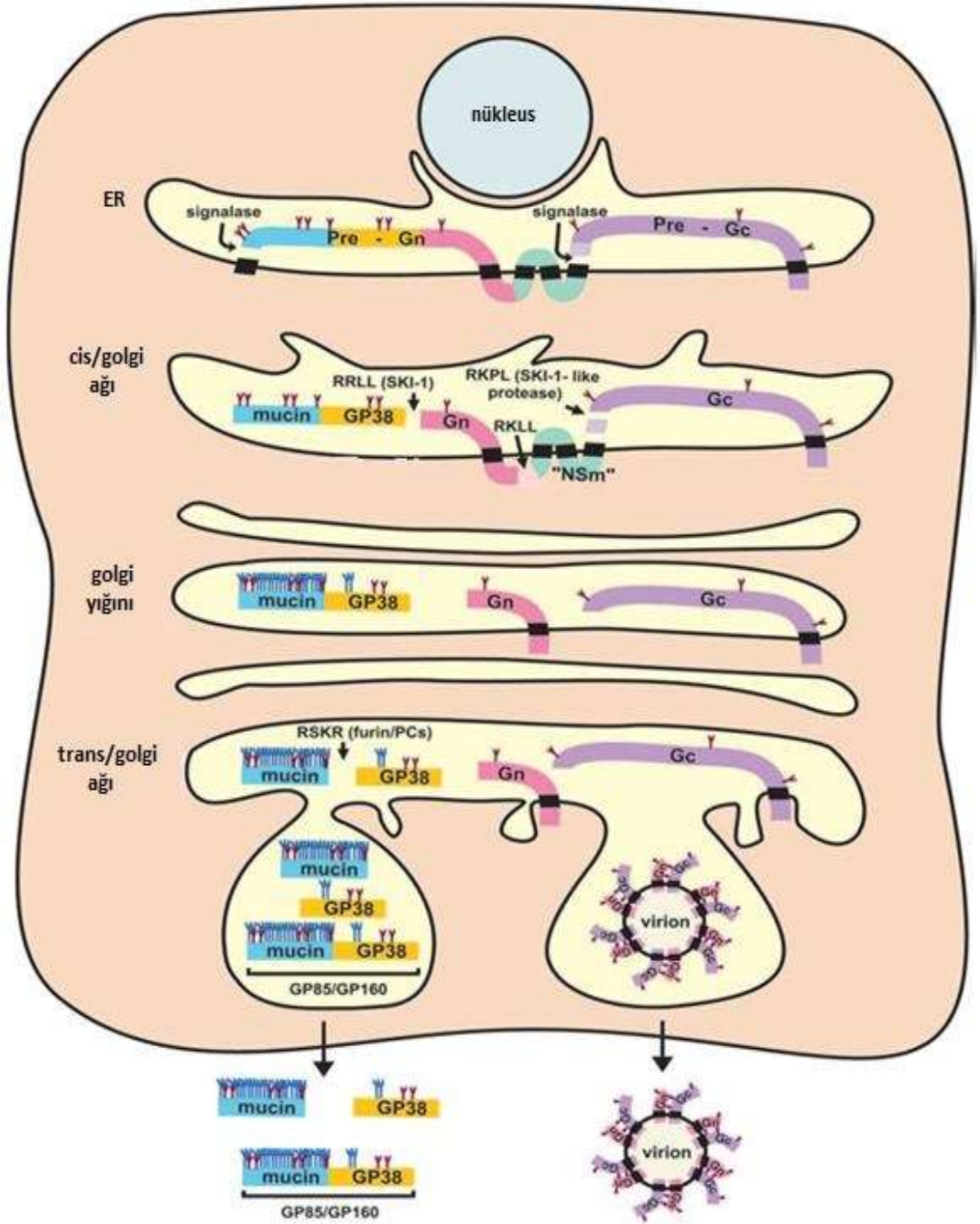
SP: Sinyal Peptid. Beş siyah sütun glikoprotein zar kat eden helikazları temsil eder.

Müsin benzeri değişken bölgenin N-terminal ucu, konak hücre müsinlerine oldukça benzerdir ve serin, treonin, prolin amino asit dizilimi KKKA virüsünün

tüm suşlarında korunmuştur (% 47,3). Müsin benzeri değişken bölgenin bol miktarda O-glikoz içermesi virüsün yaşam siklusu için fonksiyonel ya da yapısal olarak önemli rol oynamaktadır. Özellikle karbonhidrat heterojenliğini sağlayarak virüsün değişik moleküllere bağlanmasını sağlar. Ayrıca müsin benzeri değişken bölgede bol miktarda prolin varlığı β -dönüş konformasyonlarını indükler ve muhtemelen O-bağlantılı oligosakkaritlerin paketlenmesini sağlar. Bu bol miktarda paketlenmiş O- bağlantılı şekerler virüsü proteazlardan koruduğu düşünülür (Sanchez ve Ark., 2002).

Cis/golgi ağında RRLL bölgesinden SKI-1 kesim ile müsin bölgesi ve fonksiyonu bilinmeyen Gp38 proteini ve Gn ayrımı, RKPL bölgesinden ise SKI-1 benzeri proteaz ile kesimi sonucu Gc ayrımı gerçekleşir. Ayrıca Bunyaviridae ailesi diğer üyelerinde de görülen ve Nsm (yapısal olmayan protein) olarak adlandırılan bir parçanın ortaya çıktığı belirlenmiştir. Gn glikoproteininin oluşmasından hemen önce C-terminal ucundan bir kırılma olduğu ve kalan parçanın tekrar golgiye taşındığı belirlenmiştir (Şekil 5) (Altamura ve Ark., 2007).

Trans/golgi ağında ise SKI-1 aracılığıyla kesim sonrası oluşan müsin ve Gp38 serbest bırakılır ve glikoproteinler salgı yolundan geçerken müsin kısmına O-glikanlar eklenir. Burada nükleokapsid, L ve RNA genom ile birleşerek virüs serbest hale gelir ve hücre zarına geçer. Ayrıca Gp38 ve müsinin bir arada olduğu tanımlanamayan Gp85/Gp160 çözünür protein formu önemli miktarlarda ortama salınır (Şekil 5) (Sanchez ve Ark., 2006).



Şekil 5- KKA Virüs olgun glikoprotein oluşumu günümüz modeli.

M RNA segmentinin kodladığı glikopoliprotein ER signalaz aracılığıyla 140kDa PreGn ve 85kDa PreGc ye ayrılır. PreGn'den ER/cis golgi ağında RRLL bölgesinden SKI-1 proteaz ile kesilerek Gn ve Gp38 oluşur. PreGc'den, ER/cis golgi ağında RKPL bölgesinden SKI-1 benzeri proteaz ile kesilerek Gc oluşur. Olgun Gn ve Gc glikoproteinleri virionun bir araya geldiği ve salındığı golgide lokalize olur.

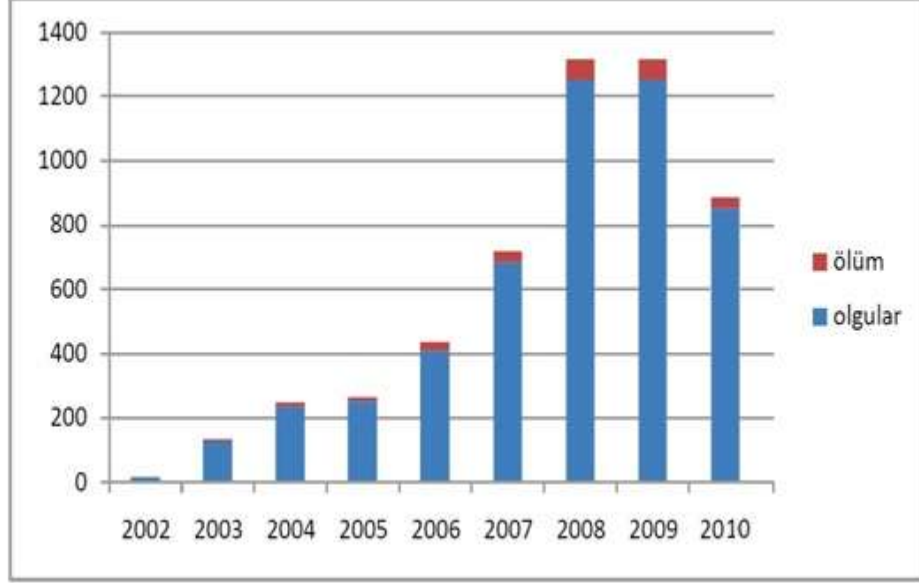
Epitelyal hücrelerin sıkı bileşkelere yapısı, yarı hücrel geçirgenliğini ve vasküler homeostazisini düzenler. KKKA virüsünün epitelyal hücrelere girdiği ve bu hücrelerden salındığı bölgeler bilinmemektedir. Ancak sıkı bileşkelere direk ya da dolaylı etki hastalardaki kanamanın nedeni olduğu düşünülmektedir. MDCK-1 epitel hücreleri ile yapılan bir çalışma da, ilk kez KKKA Virüsünün epitelyum hücrelerine basolateral kısımdan girdiği gösterilmiştir. KKKA Virüsünün kullandığı reseptörler basolateral yerleşimli olduğu tahmin edilmektedir. Bunyavirüslerin kullandığı spesifik reseptörler bilinmemektedir. Benzer biçimde KKKA Virüsü, MDCK-1 epitel hücrelerinin basolateral yüzünden salınmaktadır. KKKA Virüsünün, MDCK-1 epitel hücrelerine sitopatik etkisi ve sıkı bileşkelere etkisi saptanmamıştır (Connolly-Andersen ve Ark., 2007).

1.2- Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin Türkiyede ve Dünyadaki

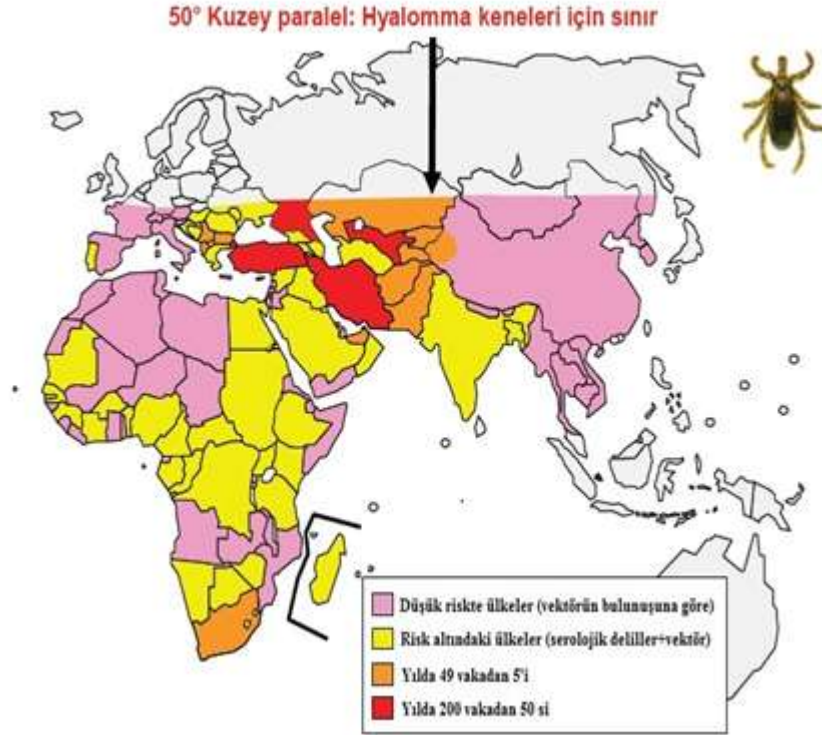
Dağılımı

Ülkemizde bugüne kadar saptanan ilk viral kanamalı ateş (VKA), Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA)'dır. Daha önce sadece Ege bölgesinde % 9 oranında serolojik pozitiflik bildirilmiş (Serter, 1980) ve 2002 yılından itibaren ise çok sayıda hasta kaydedilmeye başlanmıştır (Tablo 1). Bu güne kadar, ağırlıklı olarak Tokat, Yozgat, Çorum, Sivas, Kastamonu, Karabük, Gümüşhane, Erzurum, Amasya, Çankırı, Giresun ve Samsun'dan olmak üzere, 300'den fazla ilçeye bağlı 2000 kadar kırsal yerleşim biriminden 4448 olgu kaydedilmiş olup, bunların 218 (%4,9)'i ölümle sonuçlanmıştır.

Tablo 1- Türkiye’de görülen KKKA olgu ve ölüm sayıları (Sağlık Bakanlığı 2010)



Viral kanamalı ateşler içinde dünya coğrafyasında da en yaygın olarak görülen Kırım Kongo Kanamalı Ateşidir ve 30’un üzerinde ülkede görülür. 1970’lerden önce olguların çoğunluğu Sovyetler Birliği (Kırım, Astrahan, Rostov, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan), Bulgaristan ve çok daha fazla olmak üzere Zaire (Congo) ve Uganda’dan bildirilmiştir. Çin’de 1965 yılında %80 mortalite ile seyreden bir salgın bildirilmiş, ancak detaylı bilgi verilmemiştir. 1970 ve 2000 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti, Kongo, Moritanya, Burkina Faso, Tanzanya, Senegal’den detaylı çalışmalar sunulmuş, Orta Doğu ülkelerinden Irak, Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan, Umman Sultanlığı ve Çin’den önemli sayıda olgu bildirilmiştir. 2000 yılı itibariyle Pakistan, İran, Senegal, Arnavutluk, Yugoslavya, Bulgaristan, Türkiye, Kenya ve Moritanya’da ve Yunanistan’da yeni salgınlar bildirilmiştir. Hindistan, Mısır, Portekiz, Macaristan, Fransa ve Benin’den serolojik bulgular bildirilmişse de olgu rapor edilmemiştir. KKKAV, Balkan yarımadasında Romanya endemiktir (Şekil 6).



Şekil 6- KKKA'nın dünyada coğrafi dağılımı.

Pembe renk düşük riskteki ülkeleri, sarı renk risk altındaki ülkeleri, turuncu renk ve kırmızı renk ise vaka sayısına göre ayrımı temsil etmektedir.

Hastalık vektör kene ekolojisi ile sıkı sıkıya ilişkili olup mevsimsel özellik gösterir. Kuzey Yarımküre'de olgular ilk olarak Mart/Nisan aylarında görülmekte, Haziran ve Temmuz aylarında en yüksek düzeye ulaşmakta ve Eylül, Ekim aylarında azalarak kaybolmaktadır.

1.3- Bağışıklık Sistemi ve Toll Benzeri Reseptörler

Bağışıklık sistemi, doğal (spesifik olmayan) ve adaptif (sonradan kazanılan) olarak iki kısımda incelenebilen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle çok hassas ilişki ve denge içerisinde çalışarak konağı patojenlere karşı korunmasını sağlar.

Doğal bağışıklık sistemi doğumdan itibaren oluşan, konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıları tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemidir. Doğal bağışık sistem, bağışıklık hücreleri ve çeşitli molekülleri içerir.

Hücresel elemanlar polimorfonükleer lökosit, monosit, makrofaj, eozinofil, bazofiller ve mast hücreleridir. Ayrıca bağışıklık sistemi çözünür faktörler olarakta bilinen sitokinler, akut faz reaktanları ve kompleman sistemini de içerirler (Takeda ve Akira, 2004).

Organizmanın infeksiyonlarla mücadelesinde hem evrimsel olarak eski hem de oldukça evrensel olan doğal bağışıklık sistemi, adaptif bağışıklık sistemiyle kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir belleğe sahiptir. Adaptif bağışıklık sistemi, spesifik antijenle tekrarlı karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşmasını sağlar. Adaptif immün sistem spesifiktir ve klonal seçim tarafından gelişir. Genlerin yeniden düzenlenmesiyle üretilen antijen spesifik reseptörler lenfositlerin bir geniş repertuarında yerini alır. Bu mekanizma konakta immünolojik hafıza üretimini sağlar. Adaptif bağışık sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara “hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar” (PAMP) denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde patojenleri tanıyan reseptörlere “Patojen tanıyan reseptör” (PRR) adı verilmektedir. Doğal bağışık yanıtlar PRR’ler tarafından başlatılır. PRR’ler doğal bağışık cevabın başlatılmasını sağlar ve mikroorganizmanın hayatta kalması için temel mikrobiyal bileşikleri tanıır. Farklı PRR’ler spesifik ligandlarla tepkime verirler ve antipatojen yanıtlara yol açar. PRR’ler eşey hücre öncülleri tarafından kodlanmış, klonal olmayan ve temel olarak konakta üretilen bileşiklerdir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır. TLR’ler bakteriden mantarlara protozodan virüslere kadar çok geniş çerçevede doğal bağışıklıkta büyük rol oynar. Toll benzeri reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal bağışık cevabın oluşmasını sağlayan tip 1 zar kat eden proteinleridir. TLR’ler patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan bir grup PRR dir. Aynı zamanda adaptif bağışık cevabın aktive

olmasını sağlayarak konak bağışıklığında çok önemli role sahiptirler (Medzhitov ve Janeway, 2002).

1.3.1- İnsan Toll Benzeri Reseptörleri

İlk kez *Drosophila*'da embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı ve daha sonra immün sistem cevabının oluşumunda önemli fonksiyonu olduğu tesbit edilen bu reseptöre ‘‘Toll’’ adı verilmiştir. Daha sonra 1997 yılında TLR lerin insan homoloğu tespit edilmiş ve şaşırtıcı bir şekilde doğal immün sistemin parçası olduğu görülmüştür (Kawai ve Akira, 2004). İnsan Toll Benzeri Reseptörleri (hTLR) yapılan çalışmalarla öncelikle beş tanesi tanımlanmış ve daha sonra insan genom projesinin tamamlanmasıyla sayısı ona çıkmıştır. Günümüzde,10 farklı insan Toll Benzeri Reseptör tanımlanmıştır. İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR-4 olmuştur. Ayrıca her bir TLR için bu güne kadar tanımlanmış farklı PRR’ler bulunmaktadır (Tablo 2).

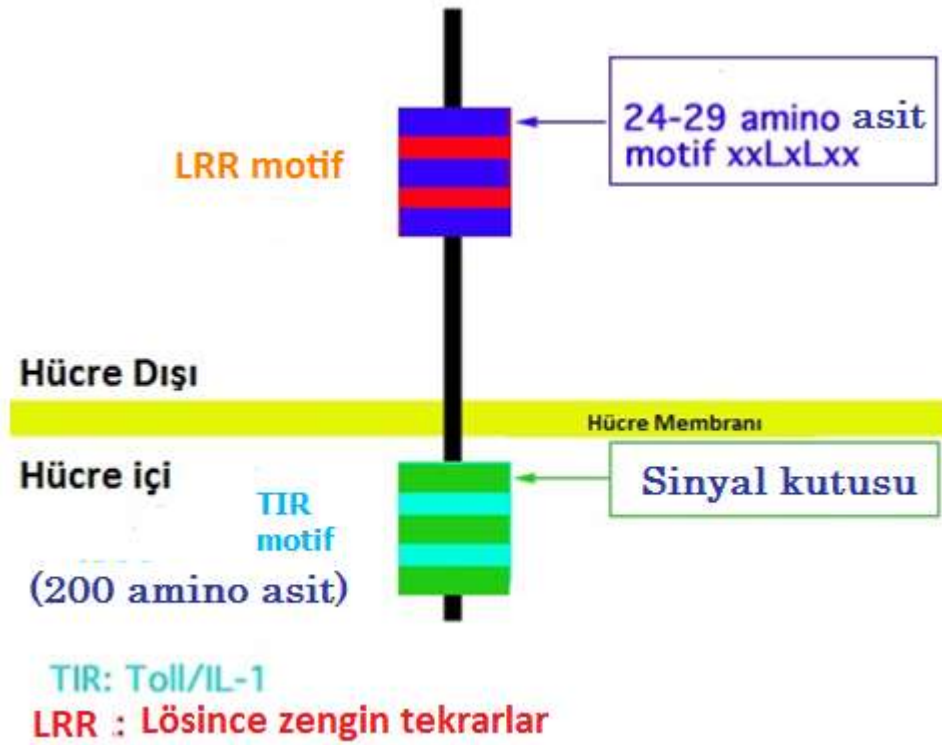
Tablo 2- İnsanda TLR’lerin patojenlerde tanıdıkları bazı tanımlanan patojen ilişkili moleküller

TLR	Patojen İlişkili Moleküller (PRR)
TLR 1	Triaçillipolipeptidler
TLR 2	Lipoteoik asit, lipopeptidler, Zymosan
TLR 3	Çift Zincirli RNA
TLR4	Lipopolisakkaritler, Füzyon Proteini
TLR5	Flagella
TLR6	Diaçillipolipeptidler, Lipotoik asit, Zymosan
TLR7	Üridin ve riboz içeren tek zincirli RNA
TLR8	Tek zincirli RNA
TLR9	CpG-DNA
TLR10	Bilinmiyor

1.3.2- Toll Benzeri Reseptörlerin Temel Yapısı

Karakteristik olarak TLR’ler; hücre membranına ya da hücre içi bölmelerde hücreler arası, zar kat eden ve hücre içi sinyal motiflerinin bileşimlerinden oluşmuş TipI zar kat eden glikoproteinler şeklinde yerleşmişlerdir (Şekil 7). TLR’ler hücreler arası kısmı PAMP’lara bağlanan lösine zengin

tekrarlar (LRR) içerir. Memelilerde LRR motifler her biri 24-29 amino asit içeren, 19-25 tekrarlı LRR motifleridir. TLR'lerin hücre içi (stoplazmik) motifi interlökin reseptör ailesinin bir benzeridir. Bu nedenle IL-1R, Ig motif üyesidirler ve Toll/IL-1 (TIR) motifi olarak adlandırılırlar. Ligand bağlı TLR dimerizasyonu ile sinyal başlamasını tetikleyen adaptör proteinin işe girmesi hücre içi TIR motifine bağlanarak olur. Ancak TLR'lerin hücreler arası bölgesi ile TIR tümüyle farklıdır (Akira, 2003).



Şekil 7- TLR Yapısının şematik görünümü

İnsan TLR dışmotif yapısındaki LRR'ler yaklaşık 24 amino asite sahiptir. Fonksiyonel olarak proteinlerin çeşitli süper ailesi tüm hücrelerde ve hücreler arası kompartımanlarda bulunur. Günümüzde İnsan genom dizisinde 250 LRR proteini tanımlanmıştır. TLR'lerde LRR'lerin blokları, genellikle disülfid bağları ile kararlı bir yapıya sahiptir. İnsan Toll Benzeri Reseptörleri tekrar sayısı TLR türüne göre farklıdır. TLR 1, TLR2 ve TLR 6'da 20 den fazla ve TLR 7, TLR8 ve TLR9'da 10-27 arasındadır. TLR dışmotiflerinin diğer önemli özelliği glikozlanmış olmasıdır. Glikozlanma tekrar sayısı TLR2'de 4 adet ve TLR 3'te ise

11 adettir. Dış motifler yaklaşık 22 amino asitten oluşan hidrofobik zar kat eden dizi ile hücre içi kısma bağlanması için α -heliks kıvrımlarından oluşur. Zar kat eden motifin stoplazmik kısmı, TIR motifi olarak adlandırılan bir globuler katlı membrana bağlanır (Şekil 7). TIR motifi yaklaşık 200 amino asit içerir ve bakteriyel Che Y'nin (Bakteri kemotaksis protein) α ve β yapısına benzer şekilde katlanır (Dunne ve Ark., 2003).

1.3.3- Toll Benzeri Reseptörlerde Ligand Tanımanın Moleküler Mekanizması

TLR ler tarafından sinyal iletiminin temel mekanizması, çoğu diğer Tip1 reseptörler de olduğu gibi ligand indükleyen çapraz dimerizasyonlar şeklindedir (Gay ve Ark., 2006). Bu hücreler arası çapraz bağlanma membranın diğer tarafına taşınarak stoplazmik motifin yeniden düzenlenmesine neden olur ve sırasıyla aşağı yönde sinyale neden olur. Örneğin, reseptör tirözün kinazdaki çapraz fosforilasyon bu duruma en iyi örnektir. Aktif olmuş TLR'ler diğer Tip1 reseptörler gibi bir enzimatik aktiviteye sahip değildir. Bunun yerine yeniden düzenlenmiş TIR motifler aşağı sinyal çeviricinin iş yapması için bir yapı iskelesi olarak hareket eder.

TLR 3, TLR7, TLR8 ve TLR9 grup nükleik asit türevlerine ya da pürin nükleotidine yapısal olarak benzeyen küçük moleküllere cevap oluşturur. Ek olarak, diğer TLR'ler gibi hücre zarına yerleşik değildir, hücre kompartımanlarında yer alırlar (Latz ve Ark., 2004). Çoğunlukla endoplazmik retikulumun asitlenmiş kompartımanlarda yer alır ve işlev görür (Örn. Endozom ve lizozomda.). Böylece asitlenmiş kompartımanlarda endoplazmik retikulumdan bu reseptörlerin trafiği kontrol edilir. Hücre içi lokalizasyon kendi nükleik asitleri tarafından immün cevabın aktivasyonunu önlemede önemli olabilir. TLR dış motif yapısı bu reseptörler tarafından nükleik asid tanımlanmasının anlaşılmasında önemli avantajlar sağlamıştır. Bu grup direk olarak iş görür ve MD-2 gibi ko-reseptörlere gerek duymaz.

TLR3 dış motifi çift zincirli RNA tanır. TLR3'ün yapısındaki iki dizi LRR12 pozisyonunda H539 ve LRR20 pozisyonunda ise N541 tanımlanmıştır. Bu diziler dış motifin lateral yüzeyinde yer alır. Bunlar glikolizasyondan yoksundur ve asparjin dizisi çift zincirli RNA'nın 2'ribozundan bir H alır. Bu etkileşim RNA için bir spesifite sağlar. Oysaki DNA'nın 2'pozisyonunda bir hidroksil grubunun olmayışından dolayı yolun aktivasyonu ya da dışmotife bağlanma olmaz. Ayrıca son yıllarda TLR3 sinyal fonksiyonuna etkisi olan LRR 18-20 amid dizileri bulunmuştur (Ranjith ve Ark., 2007). Bunlar da glikozdan yoksun lateral yüzey üzerinde yer alır ve yan zincir amidler sokularak çift zincirli RNA'nın daha geniş yüzeylerde bağlanmasını sağlar.

TLR9, metillenmemiş CpG DNA tanır ve nükleik asit ile reseptör bağlanması direk gerçekleşir (Rutz ve Ark., 2004). TLR9 dışmotifi CpG DNA ya yüksek afiniteyle bağlanır ve bu bağlanma pH'ya bağlıdır.

TLR8, tek zincirli RNA ve imidazolkinonla ilişkilidir. Negatif yüklü dizilerin girişi ligandlarda pH'nın değişimine neden olur. Bu durum bağlanmaya olanak sağlar. Örneğin resiquimod imidazol grubu yaklaşık 6.7 değerinde bir pKa ya sahiptir. Reseptörden proton geçişiyle pH:5 olur. Böylece dış motifin negatif yüklü bölgesine pozitif yüklü ligandın bağlanması ile hidrofobik etkileşimler sonucu iki reseptör zincirinin bağlanması sağlanır.

1.3.4- Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Mekanizması

TLR'ler etkinleştirildiklerinde bir sinyali başlatmak için aracı molekülleri uyarırlar. Sinyallemeye ilişkili olarak dört aracı molekül bilinmektedir. Bu moleküller MyD88, TIRAP (Mal diye de bilinir), TRIF, ve TRAM proteinleridir. Bu araçlar hücre içindeki diğer molekülleri, sinyali yükselten belli protein kinazlarla (IRAK1, IRAK4, TBK1 ve IKKi) etkinleştirirler ve nihayetinde yangı yanıtını planlayan genlerin baskılanmasına ya da göreve getirilmesine öncülük eden binlerce gen etkinleştirilir. TLR'ler farklı canlı tiplerinde, yerleşim gösteren farklı bağlayıcılar tarafından bağlanır ve etkin hale getirilirler. TLR'ler hücre yüzeyinde ve hücre iç bölmelerinde yerleşim gösterirler ve etkileşmeye yanıt

verecek farklı araçlar bulundurlar. Ayrıca, lökositlerde ve diğer farklı hücre tiplerinde ifade edilirler. Mikrobiyal kaynaklı bazı bağlayıcıların etkinleştirilmesini izleyen bazı reaksiyonlar görülebilir. Bağışıklık hücreleri yangıyı tetikleyen "sitokin" denilen sinyal faktörleri üretebilirler. Bakteriyal faktörün uyarması durumunda, patojen fagositte edilerek sindirilir. Viral faktör uyarısında ise enfekte hücre protein sentezini durdurur ve hücreyi programlanmış hücre ölümüne (apoptozise) götürür. Bağışıklık hücreleri virüsleri bulduklarında interferonlar gibi anti-viral faktörleri salarlar. Doğuştan gelen bağışıklığın fonksiyonlarından sorumlu TLR'ler uzun yıllar çalışılmışlardır. İlginç olan, TLR'ler sadece sitokin üretimi ve mikroorganizmalara karşı hücresel yanıtın etkinleştirilmesiyle ilişkili değil, hem de mikroorganizmaların adezyon ve fagositozunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kawai ve Akira., 2006).

TLR'lerde sinyal iletiminin temel mekanizması ligand indükleyici dimerizasyon ya da oligomerizasyondur. Aktivasyon süreci basit bir çapraz bağlanma değil, ilgili proteininde konformasyonel değişimleri içerir. Ligand bağlanması, dış motifin C-terminal bölgesinde bir konformasyon değişimi ile gerçekleşir. Bu kararlı reseptör-reseptör etkileşimini sağlar ve bu tavırla reseptör dimerinin sırasıyla zar kat eden helikazların düzenlenmesi ve aşağı yönlü sinyalin ortaya çıkmasını sağlar (Kawai ve Akira., 2006).

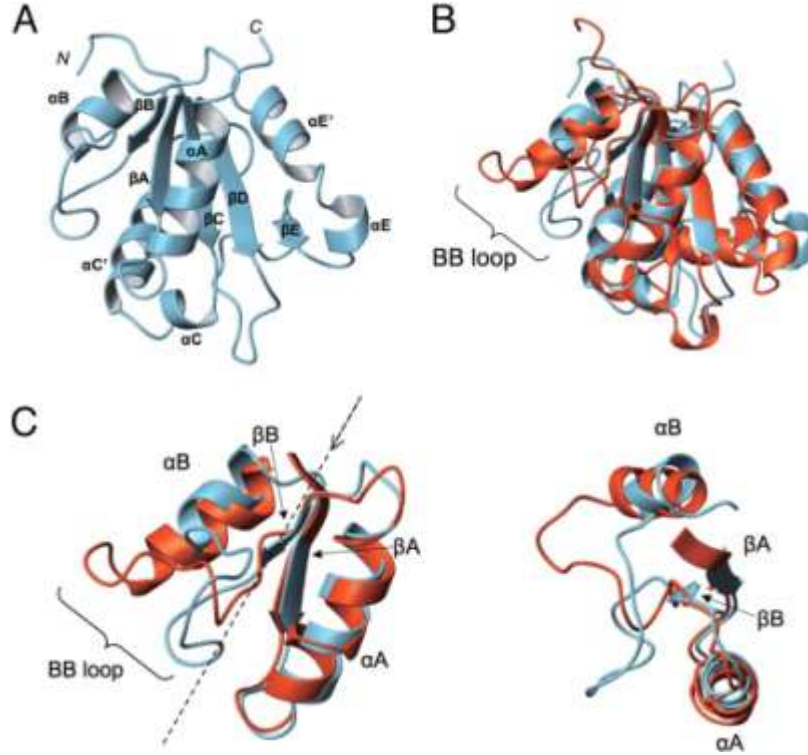
1.3.5- Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Mekanizmasında

Kullanılan proteinler

TLR'in sinyal mekanizması enzimatik bir reaksiyon şeklinde değildir. Bu mekanizma, reseptör ligandıyla birleştikten sonra stoplazmik kısımları sinyal şelalelerini oluşturmak için birçok arabulucu molekülün işe girmesiyle birbirini takip eden konformasyonel değişimlerle gerçekleşir. Sinyalin moleküler temeli onların hücre içi motiflerinin korunmuş dizileri sayesinde gerçekleşir. Bunlar Toll/IL-1 reseptör (TIR) motifi olarak adlandırılır. TLR dimerizasyonunda görev alan tüm proteinler bu korunmuş parçalara sahiptir ve bir ara parça görevi görerek TIR-TIR yapısını oluştururlar. Bu sebepten dolayı bu proteinler adaptör (aracı) olarak adlandırılır. Şimdiye kadar TLR sinyal iletim yolağında 5 adaptör

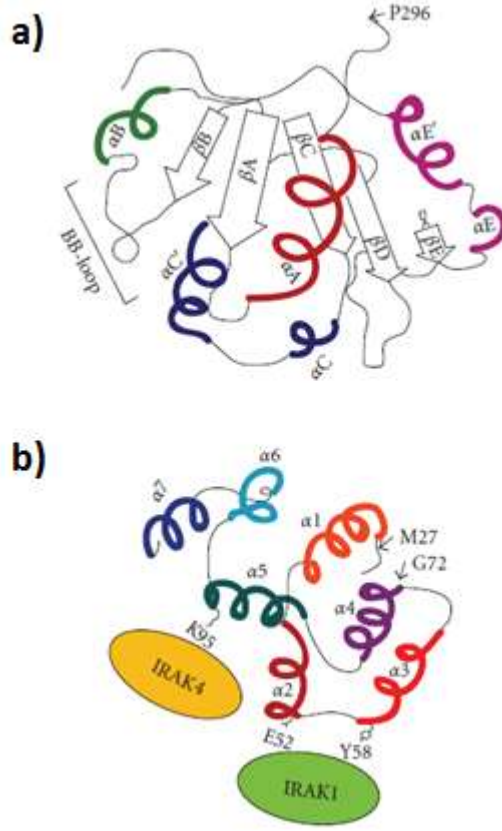
tanımlanmıştır. Bunlar MyD88, Mal (TIRAP), TRIF (IFN- β /TICAM1), TRAM (TICAMII) ve SARM adaptörleridir. TLR sinyal iletiminde ilk dört adaptör temel rol oynamaktadır. TLR'lerin LRR kısmına ligand bağlanmasıyla stoplazmik kısmında hücre içinde ilk bağlanan adaptör MyD88 veya TRIF'dir. Bunlar ilk hücre içi sinyal veren adaptörler olarak bilinirler. Bu nedenle TLR'ler bu iki farklı adaptör yolağını kullanarak sinyal şelalelerine katılacak adaptör proteinleri düzenler.

TLR sinyal iletimi için bulunan ilk esansiyel adaptör MyD88'dir. MyD88 ilk kez Myeloid dokularda ifade edilen bir protein olarak tanımlandı ve myeloid farklılaşmanın ilk cevap geni olarak izole edildi. 'MyD' Myeloid farklılaşma için atfedilmiş ve '88' ise MyD88 proteinini ifade eden genlerin sayısını temsil etmektedir. MyD88 mRNA seviyesi sınıflandırma için belirteç olarak kullanıldı (Lord ve Ark.,1990a). Bulunuşundan dört yıl sonra MyD88 Toll/IL-1 reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Hultmark ve Ark., 1994; Yamagata ve Ark., 1994). MyD88'in, IL-1 ve çoğu TLR tarafından sinyal iletiminin uyarılmasında önemli rolü olduğu bulunmuştur (Bonnert ve Ark., 1997). Genellikle MyD88, TLR3 dışında tüm TLR'lerin sinyal iletimine arabuluculuk eder. MyD88 üç ana motifden oluşur: N-ucu DD (Ölüm Motif), C-ucu TIR motifi ve iki motifi birbirine bağlayan kısa bağlayıcı (ID) motiftir. MyD88, DD-DD ve TIR-TIR homodimerleri şeklinde reseptör kompleksine bir dimer olarak katılır (Şekil 8).



Şekil 8- MyD88 kompleksinin yapısı

NF-KappaB, p38 ve JNK aktivasyonu MyD88'e bağlıdır (Şekil 10). MyD88 sinyal iletiminin çalışması MyD88 bağlı yol tüm TLR'lerde NF-KappaB, MAPK aktivasyonunun gerçekleştiği IL-1RI yoluna çok benzerdir. IL-1RI, IL-1RacP ve MyD88 protein kinaz olmamasına rağmen bir IL-1RI bağımlı kinaz aktivitesi IL-1 tarafından uyarılan hücrelerden reseptörlerle bağlantısı sağlanarak gerçekleşir. Bu kinaz IL-1 cevabı için gereklidir (Croston ve Ark.,1995). Reseptör ile serin/threonin kinaz bağımlı, insan embriyonik böbrek (HEK) 293-hücre (aşırı ekspresyon IL-1R transfectedir) hattı saflaştırılmıştır. Bu enzim IRAK olarak adlandırılmıştır (Cao ve Ark.,1996a). IL-1RI ya da TLR ile MyD88'in birleşmesi reseptör sinyal iletim kompleksi IRAK'ların uyarılmasıyla sonuçlanır. Memelilerde dört farklı IRAK üyesi tanımlanmıştır (IRAK1, 2, M, 4). Bu üyelerin ifade edildiği yerler farklıdır. IRAK-1 ve IRAK-4 tüm dokularda ifade edilir. IRAK-2 daha sınırlı hücresel dağılıma sahiptir ve IRAK-M myeloid kökenli hücrelerle ifade edilir. IRAK'lar; N-terminal DD ve bir merkezi Ser/Thr kinaz motif içerir. IRAK-1, MyD88'in DD ile homofilik etkileşimiyle reseptöre katılır. MyD88, IRAK-4'e ID yoluyla bağlanır (Şekil 9).



Şekil 9- İnsan MyD88 TIR motifi.

a) MyD88 TIR motifi ilmeklerle bağlantılı 4 α helikazla sarılmış beş merkezi β ipliklerin birleşimidir. BD ve βE iplikler arasında αD yoktur. Bu bölge helikal sarmallı konformasyona sahiptir.

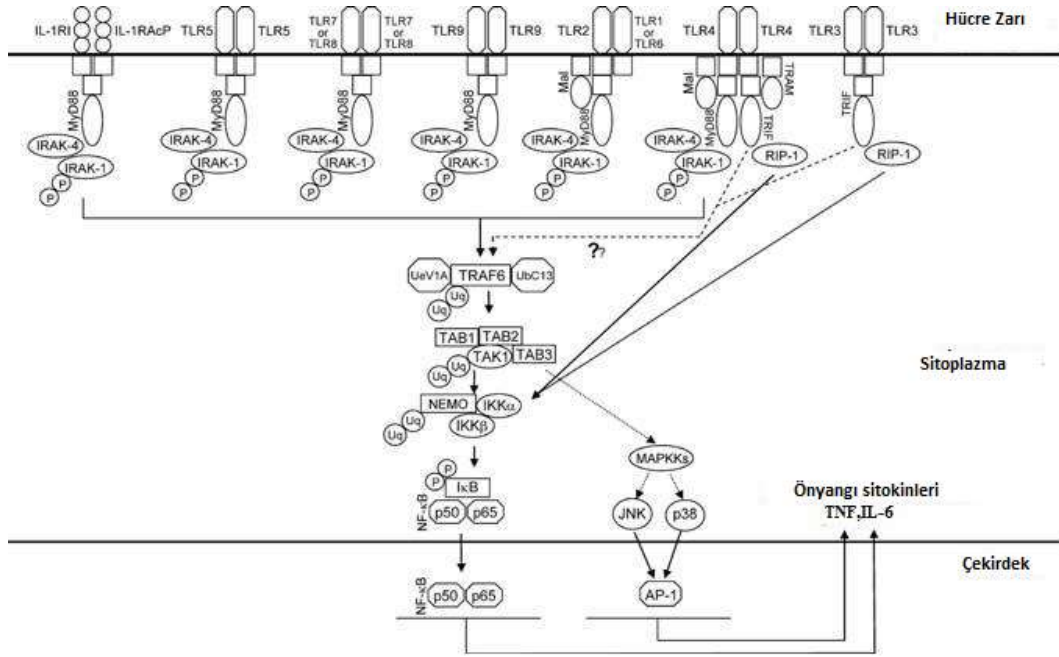
b) IRAK1 ve IRAK4 ile MyD88 ölüm motifin etkileşim yüzeyi.

27-72 diziden oluşan MyD88 DD bölgesi (α1,α2,α3 ve N-ucu α4 heliks) IRAK1 in işe girmesi için gereklidir. MyD88 DD si dizi E52 ve Y58, MyD88 ile IRAK1 etkileşimi sağlar. α5 heliks ile K95 dizisi MyD88 DD ve IRAK4 etkileşimini sağlar.

IRAK ailesinin diğer iki üyesi IRAK-2 ve IRAK-M inaktif kinazdır (Muzio ve Ark., 1997). Bu IRAK'lar, IL-1RI ve belirli TLR'lerin negatif regülatörüdür. MyD88'den IRAK-1' in ayrılmasını engeller ve aşağı sinyal olayında bitişik protein TRAF-6 ile IRAK-1 kompleks formasyonunun ayrılmasını engeller. Bu durumda transkripsiyon arttırıcı TRAF6 serbestlenemez. Özellikle tümör, lösemi ve metazatik hastalıklarda IRAK-2 ve IRAK-M ifadesi oldukça yüksektir. MyD88 yolundaki reseptör komplekslerine karışan IRAK'lar tümüyle açıklanmış değildir. IRAK-1 çoklu fosforlandığı zaman, reseptörlerden ayrılır ve TRAF6'ya bağlanır. IRAK-1'de üç adet TRAF6 bağlanma motifleri (Pro-X-Glu-X-X-aromatik/asidik dizi) mevcuttur. TRAF' lar, tümör nekrosiz

faktör (TNF) reseptör ilişkili (memelilerde 6 adet olan) korunmuş adaptör proteinlerin bir ailesidir. TRAF proteinin yapısal modeli TRAF-N motifi ve bir korunmuş TRAF-C motifi ile karakterizedir. TRAF-C motif, yukarı sinyal reseptörleri ve sinyal proteinleri ile etkileşir. Çoğu TRAF proteinlerinin N terminal kısmı halka parmak/çinko parmak bölgesi içerir, bu yapı aşağı sinyal olayları için gereklidir. TRAF6, hem TNF reseptör süper ailesi hem de IL-1R/TLR süper ailesi için sinyal iletiminde ara bulucu olarak hareket eder. TRAF6, doğrudan TNF reseptör süper ailesinin üyesi olan CD40 ve TRANCE-R (tümör nekrosiz faktör aktivasyonunu indükleyen reseptör) ile etkileşir. TRAF-6 dolaylı olarak da IL-1/TIR reseptör aktivasyonuna bağlanır ve IRAK'la birleşerek karmaşık sinyal yola girer. TRAF-6 aşağı sinyal yolunda, MAPK3 olarak da bilinen TAK1'e bağlanır. TAK1 ise, iki adaptör protein TAB1 ve TAB2'yi kendine bağlayarak NF- κ B ve AP-1 aktivasyonunu gerçekleştirir. TAK1 mitojen aktive eden kinaz (MAPK) ailesindendir. TAK1, hem IL-1 hem de TNF- α indükleyen NF- κ B aktivasyonu için gereklidir. TAB1, TAK1'in aktivatörü olarak iş görerek kinaz aktivitesini artırır. TAB2 ise uyarılmamış koşullarda hücre membranına bağlıdır. Fakat uyarı altında sitoplazmada yer değiştirir. TAK1'i, TRAF6'ya bağlayan adaptör olarak iş görür. Böylece TAK1 aktivasyonuna imkan tanır. Ayrıca son yıllarda TAK1 aktivasyonunda ubiquitinasyonun önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Karin ve Ark., 2000). TRAF6 ile IKK (kappa kinazın inhibitörü) aktivasyonu için hem olimerik ubiquitin konjuge enzim kompleksi (Ubc13 ve Uev1A'nın birleşimi) hem de TAK1 kinaz kompleksi (TAK1, TAB1 ve TAB2) gereklidir. TRAF6, Ubc13-Uev1A kompleksinde Ubc13 ile TRAF6'nın halka parmak motifiyle etkileşerek Ubc13/TRAF6 kompleksini oluşturur. Bu yapıdaki Lys63-bağlantılı zincire ubiquitin bağlanarak TAK1 aktivasyonunu sağlar. NF- κ B uyarılmamış hücrede I κ B tarafından baskılanır. TAK1 ise NF- κ B'yı baskılayan I κ B (inhibitör kabba)'nın inhibitörünü (IKK) fosforlar. IKK'lar bir düzenleyici alt ünite NEMO (IKK gama) ve iki katalitik IKK α ve IKK β şeklinde üç alt üniteden oluşur. NEMO, IKK α ve IKK β 'nin birbirine bağlanmasını sağlayan bir yapı iskele proteini (Verma ve Ark.1995). Ayrıca NEMO, I κ B ile IKK kompleksini bağlar (Yamamoto ve Ark., 2001). IKK α ve

IKK β alt ünitesi I κ B yapısındaki 32 ve 36 pozisyonundaki serin amino asitlerini fosforlar. Bu fosforilasyon I κ B'nin degradasyonuna neden olur ve NF- κ B'dan ayrılır. NF- κ B yapısında bulunan p50, I κ B'yi bağlamak için p65 ise gen ekspresyonunun transaktivasyonu için gereklidir. Sonuç olarak, serbest kalan NF- κ B nükleusa geçer ve inflamatuvar cevaplar için hedef genleri indükler (Şekil 10).



Şekil 10- TLR Yolağı.

TLR yolağı NF- κ B, P38 ve JNK aktivasyonuna yol açar. IL-1RI ve tüm fonksiyonel TLR'ler (TLR3 hariç) sinyal yolunda hücreiçi proteinleri, NF- κ B ve MAPK'ları aktif etmek için MyD88 adaptör proteinini kullanırlar. Öncelikle MyD88, IRAK4'ü uyarır. IRAK4 kendini ve yine aynı aileden olan IRAK1 fosforlar. Fosforlanmış IRAK'lar TRAF6'a bağlanır. Burada Uev1A ve Ubc13 enzimiyle etkileşirler ve poliubikuitinlenirler. Sonra TRAF6 kompleksi TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 kompleksiyle etkileşir. TAK1 ana kinaz enzimdir ve NEMO/IKK α /IKK β kompleksini fosforlayarak aktif eder. IKK kompleksinin aktivasyonu için NEMO gereklidir. IKK'ler I κ B fosforlar ve NF- κ B alt ünitesi olan p50 ve p65 ile etkileşir. Bu fosforlanma I κ B'nin protozomal bozunmasına yol açar ve NF- κ B'nin nükleusa geçişini sağlar. NF- κ B, NF- κ B bağlanma motiflerine bağlanır ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF α , IL-6 gibi) transkripsiyonu ve ifadesi sağlanır. TAK1 hemde MAPK şelalelerine bağlanır. Bu şelalelerin iki ana proteini olan p38 ve JNK aktif olur. Onlarda transkripsiyon faktör AP-1'i aktif ederek proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açarlar.

TAK1 kompleksi IKK aktivasyonu dışında MAPK kinaz ve diğer MAPK'lara da bağlanır. Örneğin TAK1 ile fosforlanan MAPK6, JNK aktivasyonuna neden olur. MAPK3 ve MAPK7 ise p38 aktivasyonuna neden olur. Aktif olan JNK ve p38, transkripsiyon faktör AP-1 (Aktivatör protein-1) inflamatuvar cevap genlerin indüksiyonunda önemli rol oynar (Şekil 10).

MyD88 bağımlı yollar bazı interferon düzenleyen faktörler (IRFs) tarafından aktive edilir. Onlardan biri olan IRF7, TLR geçiş yollarında aktivasyonu plazmasitoitte oluşur. MyD88, IRAK-1, IRAK-4 ve TRAF-6 ile IRF7 doğrudan ilişkilidir. IRF7, nukleusa girer ve orada interferon uyaran cevap elementi (ISRE) ile bağlanır. Sonuç olarak Tip I IFN'ler (interferonlar) üretilir. Bu geçiş yolunda IRAK-1'in rolü önemlidir. IRF7'nin aktif hale geçmesi için IRAK-1 tarafından fosforlanması gerekir. TIR sinyal iletiminde MyD88 ile TIR motifin kararlı bağlanması için IRF7 aktivasyonu gereklidir.

Aynı aileden diğer transkripsiyon faktörü MyD88 yolunda aktive olan IRF5'tir. TLR4-TLR9 sinyal iletiminde IRF5, MyD88 ve TRAF6 kompleksinde görev aldığı bulunmuştur (Sun ve Ding, 2006). IRF5 nukleusa hareket eder ve sitokin genlerin promotor bölgesindeki ISRE (interferon uyaran element) motiflerine bağlanır ve IL-6, IL-12 ve TNF- α üretimini uyarır. IRF1 nukleusa geçerek belirli TLR ilişkili genleri aktif eder. IRF1 IFN- γ reseptör 1 tarafından indüklenir. Bu olay dolaylı olarak TLR aşamalı sinyal iletimi yolunu etkiler. IFN γ R1 TIR motifi içermemesine rağmen, MyD88 yolunda görev alır ve p38 aktive eder (Sun ve Ding, 2006). TRAF6'nın dışında, aynı ailenin diğer üyeleri, TIRAF3, bazı TLR lerin MyD88 bağımlı sinyal iletim yolunda görev alır.

TLR sinyal geçişi için MyD88 yalnızca gerekli bir adaptör protein değildir. MyD88'e homolog dörtten fazla adaptör vardır. Bu dört adaptörün ilki olan Mal/TIRAP sekans benzerliğinden dolayı MyD88'in homologudur (Fitzgerald ve Ark., 2001). Mal, TLR 4 MAPK'ların ve NF- κ B'nin aktivasyonunu durdurmak yerine erteler. Bu aktivasyon TLR2 hariç çeşitli TLR ligandları ve IL-1 tarafından indüklenir. Mal, TLR2 ve TLR4 MyD88 bağımlı yolun bir üyesidir. İnsan doğal bağışık sistemin aktivasyonunda Mal'nin önemi geni kodlayan adaptör bölgesinde bir mutasyonun aktivasyonu değiştirmesiyle belirlenmiştir.

S180L heterozigot bireylerde invasive pnömokoksik hastalıklar, bakteremi, malaria ve tuberküloza karşı koruduğu belirlenmiştir (Khor ve Ark., 2007).

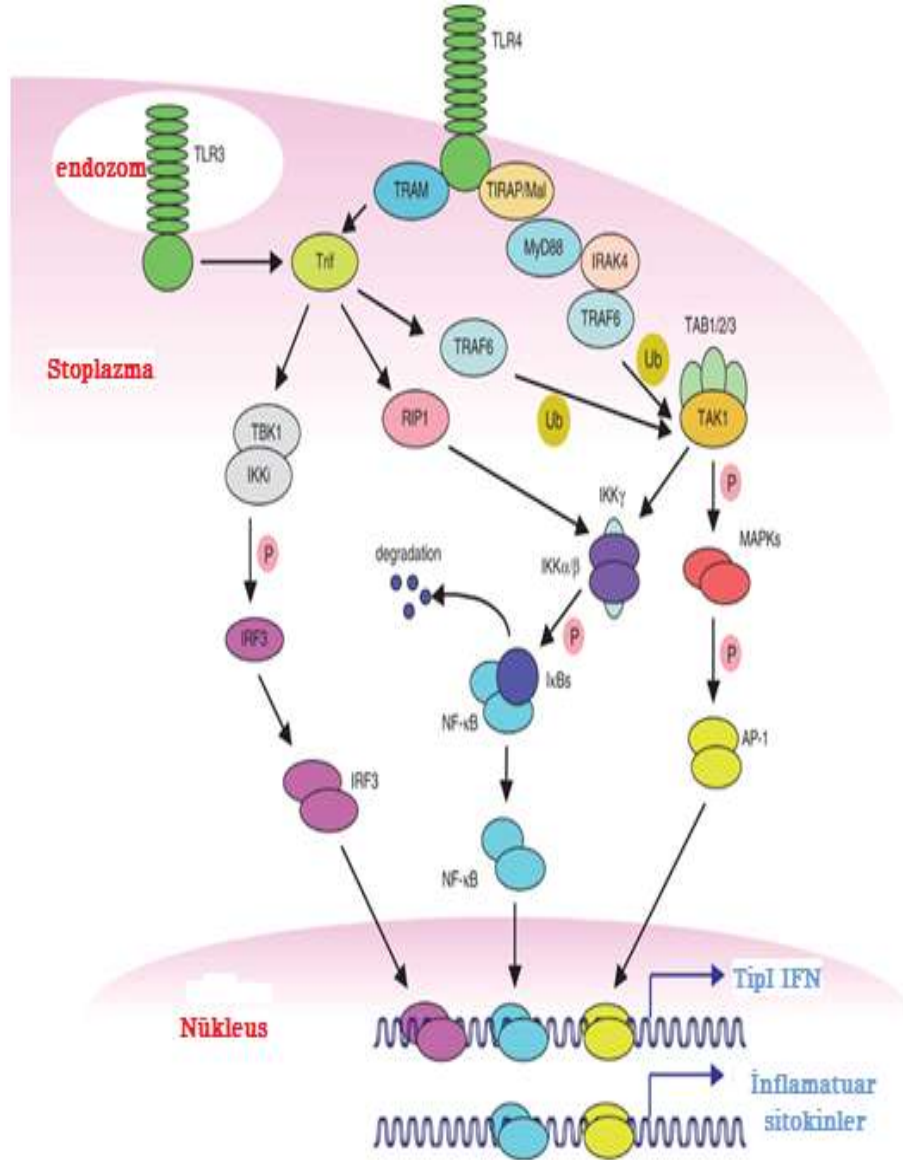
MyD88 bağımlı sinyal yolunda, TLR'lerle MyD88 bağlantısını sağlayan adaptör protein MaI plazma membranla da yakından ilişkilidir. MaI bağlanma motifi ile plazma membranın ana yapısal bileşeni olan fosfotidilinisitol-4,5-bifosfat (PIP2) bağlanarak MyD88 ile membran etkileşimini kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Fitzgerald ve Ark., 2001). Özellikle TLR4 aşamalı sinyal iletiminde MaI, MyD88 e köprü adaptör görevi yapar. Ek olarak, MyD88'in aksine MaI TRAF6 ile de ilişkilidir. Bu nedenle TLR2 ve TLR4 heterodimerizasyon çiftinin işe katılması için MaI sorumludur (Mansell ve Ark., 2004).

TLR'ler MyD88 sinyal yolu dışında ikinci bir sinyal yolu olan TRIF yolunu kullandıkları belirlenmiştir (Yamamoto ve Ark., 2003a). TLR3 ve TLR4 aşamalı sinyal yolunda TRIF (NF- κ B aktif eden kinaza TBK1'e bağlanan protein) TANK1 ve IKK (NF- κ B kinaz- α inhibitörü) benzeri kinazlar (IKK homologu olan IKK ϵ ve IRF3) ile ilkin kompleks oluşturur (Fitzgerald ve Ark., 2003a). Bu kompleks yapıdaki IKK ϵ ve TBK1, transkripsiyon faktör IRF3'ü fosforlar ve aktif eder. Sonuç olarak IRF3-IRF7 hedef genler üzerindeki ISRE'ye bağlanarak interferon (IFN)- α/β üretimini uyarır (Sato ve Ark., 2003; Kawai ve Ark., 2004). Ayrıca yine aynı aileden IRF5, TLR3 sinyal yolunda uyarılan IL-6, IL-12 ve TNF α üretimi için TRIF sinyal yolunda görev aldığı belirlenmiştir (Takaoka ve Ark., 2005).

TLR3 aşamalı sinyal yolunda NF- κ B da aktif edilir (Şekil 11). TRIF, IKK'ları aktif eden TRAF6-TAK1-TAK2 kompleksine sıkıca bağlanır. TRIF'ler yapısındaki konsesus TRAF6 bağlanma motifi içermesinden dolayı güçlü bağ yapısına sahiptir. TRIF ayrıca reseptör ilişkili protein kinaz (RIP) ailesinden olan RIP1 ve RIP3 ile etkileşir (Meylan ve Ark., 2004). RIP1, NF- κ B aktivasyonunu indükler. RIP3 ise inhibe edici etkiye sahip protein kinazdır ve RIP1 ile TRIF etkileşimini önler. Nekroz görülen hücrelerde RIP3 ifadesi fazla olduğu belirlenmiştir (Vanlangenakker ve Ark., 2010). TRIF bağlı RIP yoluyla üretilen

TNF α uyarılmış hücrelerden salgılanır ve reseptörüne bağlanır (TNFR) (Covert ve Ark., 2005).

TLR3 ve TLR4 TRIF bağımlı sinyal yolağında IRF3'ün ISRE motiflerine bağlanma şekli farklıdır (Şekil 11). TLR3, TRIF bağımlı sinyal yolağında IRF3, ISRE motiflerine homodimer formda bağlanır. Oysa TLR4 sinyalinde IRF3, NF- κ B'nin alt ünitesi p65 ile heterokompleks bir yapı oluşturarak ISRE motiflerine bağlanırlar. Ayrıca TLR3, TRIF ile doğrudan bağlanırken, TLR4 bağlanmak için köprü adaptör TRAM'a ihtiyacı vardır (Şekil 11). Viral uyarı ile TLR3 sinyal yoluyla oluşan apoptozis cevabı için RIP1, FADD ve Kaspaz-8 gereklidir.



Şekil 11- Hücre içi sinyal reseptörü.

Sonuç olarak son yıllarda TRIF sinyal yolu, dentritik hücrelerde MHCII ifadesinin uyarılması ve CD4T hücre aktivasyonu için önemli bir yol olduğu belirlenmiştir. (Kamon ve Ark., 2006) Bu süreç endotoksin cevabını ortaya çıkarır ve endotoksin sürekli bir aktivasyona neden olur. Bu konağın savunması için çok önemlidir. (Endotoksin; RhoB proteini ve Guanin nükleotid değiştiren faktor GEF-H1 içerir.)

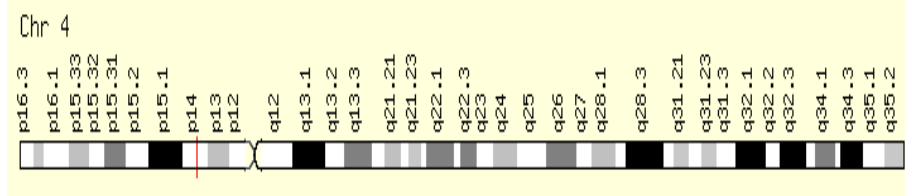
Beşinci ve son adaptör SARM, insan geni steril α motif (SAM) ile işlevi bilinmeyen bir protein kodlar ve Armadillo / β -catenin (HEAT/Armadillo tekrarları içerir) yapısal olarak benzerdir (Mink ve Ark., 2001). SARM da diğer adaptörler gibi TIR motifi içerir (Couillault ve Ark., 2004). SARM, TRIF ile etkileşerek NF- κ B ve IRF aktivasyonunu inhibe eder. SARM TRIF ile birleşirse, sinyal yolunu aktif eden diğer proteinlerle etkileşimini önler ya da diğer inhibitör proteinlerle etkileşimini sağlar. TLR3/4 inhibasyon sürecinde negatif geri bildirim (feedback) olarak iş yapar ve konak için tehlikeli etkiye sahiptir.

1.3.6- İnsan Toll Benzeri Reseptör 10 (hTLR10) Stoplazmik Motifin Kristal Yapısı Bir Sinyal Dimerin Açıklanması

Memelilerde TLR ailesinin 13 üyesi tanımlanmıştır. Bunlardan TLR1-9 insan ve fareler arasında korunmuştur. Ancak TLR10 farelerde fonksiyonel değildir. TLR 11-13 ise insan genomunda kaybedilmiştir (Akira ve Ark., 2006 ; Kawai ve Ark., 2009).

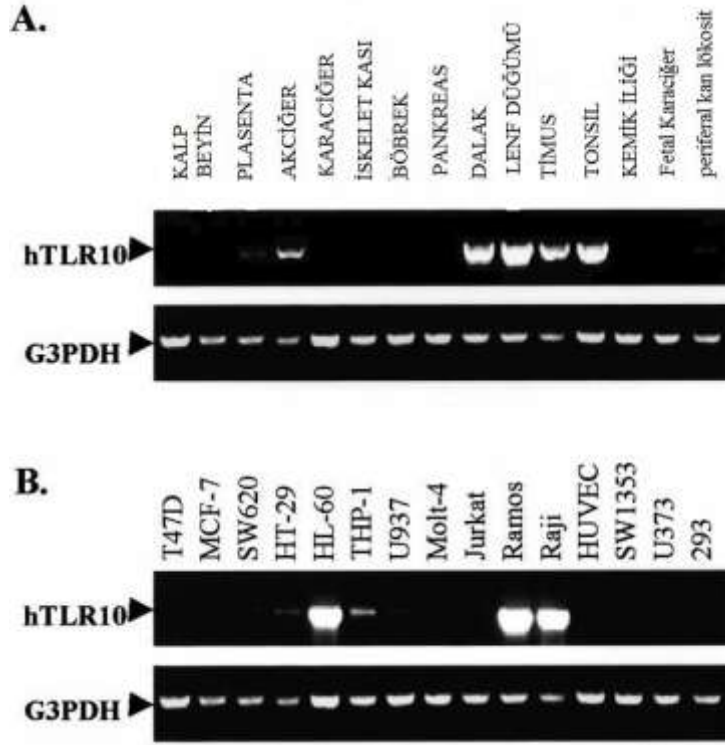
Günümüzde TLR10, TLR üyeleri arasında ligandı ve fonksiyonu bilinmeyen tek reseptördür. CD290 olarak da bilinen TLR10, TLR ailesindeki diğer üyeler gibi patojen üzerinde moleküler desen tanımaktadır. TLR10 tek bir sinyal peptid ve yapısında lösence zengin 15 tekrarlı bölge (LRR) içermektedir. Ayrıca sisteince zengin bir zar kat eden motif ve bir stoplazmik Toll İnterlökin-1 reseptör motifine sahiptir. TLR 10 gen bölgesi dördüncü kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan (4p-14), üç ekzon içeren 811 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır (Şekil 12). TLR10 tek protein uzunluğu 91-100 kDa dur. TLR10, MyD88 ve TRAF6 bileşenleriyle aşamalı sinyal iletimini başlatarak NF-kappa- β

aktivasyonunu uyarır. Bu aşamadan sonra bağışıklık sistemi hücrelerinden sitokin sekresyonuna neden olur (Uzma ve Ark., 2005).



Şekil 12. Kromozom 4 üzerinde TLR 10 Lokalizasyonu (4p-14)

İnsan TLR10 yapısında bazı TLR'lerde olduğu gibi (TLR4 yardımcı reseptörü MD-2) tam bağlanma duyarlılığı için yardımcı reseptör olmadığı belirlenmiştir. İnsan TLR10 protein yapısı yüksek oranda *N*- glikoz içerir ve glikozlanmamış kısmı ise ~80 kDa dur. Ayrıca yapısında *O*-glikoz bulunmamaktadır. Bu durum TLR10'un spesifik ligandına bağlanmasında bir ipucu olabileceği düşünülmektedir (Uzma ve Ark., 2004). Örneğin, TLR4/MD-2 yapısında, *N*-glikoz ve *O*-glikoz yüksek oranda görülür ve LPS (bakteriyel lipopolisakkarit) tanımlaması için önemlidir. İnsan TLR10 proteininin, günümüzde spesifik fonksiyonları için ligandının bilinmemesine rağmen, immün hücrelerince zengin dokularda ve hücre hatlarında ifade edilir (Şekil 13). TLR10 proteini dalak, lenf düğümleri, timus, tonsillerde yüksek oranda ve akciğerde ise daha düşük oranda belirlenmiştir. Ayrıca öncül miyelosit HL-60, Ramos ve Raji hücre hatlarında yüksek oranda ve THP-1 hücre hattında daha düşük oranda belirlenmiştir (Bourke ve Ark., 2003) (Şekil 13). İnsan TLR10, TLR1-TLR6'dan farklı olarak periferik kan B hücreleri ve dendritik plazmasitoid bademcik hücrelerinde, yapısında bol miktarda *N*-glikozilli protein içerdiği ve son derece sınırlı ifade edildiği belirlenmiştir. CD34+ progenitör hücrelerden türevli CD1a+ dendritik hücreleri altsetinde de İnsan TLR10 belirlenmiştir. İnsan T hücreleri ve Jurkat T hücre hatlarında TLR10 ifade edildiği belirlenmiştir (Bourke ve Ark., 2003) (Şekil 13).



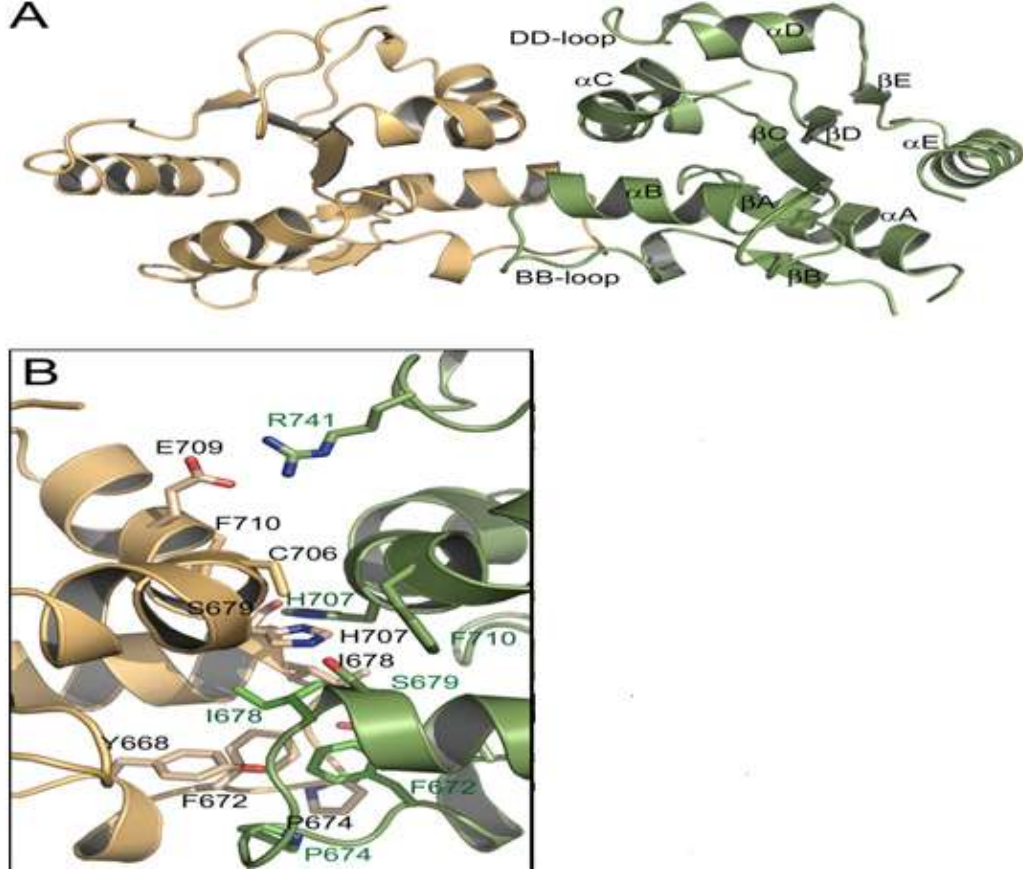
Şekil 13- İnsana ait farklı doku (A) ve hücre hatlarında (B) TLR10 ifadesi.

1.3.6.1- İnsan Toll Benzeri Reseptör 10'un Toll / Interleukin 1 reseptör (TIR) motifi;

İnsan TLR10'un TIR motifi 2.2Å kristal ve simetrik ünite yapısı belirlenmiştir. TLR'lerin hücre içi bölgelerinde, yüksek oranda korunmuş sinyal iletim motifi (TIR) olduğu bulunması ile doğal immün cevapta ve inflamasyonda bu motifler aracılığıyla reseptör sinyal iletimini gerçekleştirdiği anlaşılmıştır. İnsan TLR10'daki dimer etkileşim yüzeyi (TIR) BB-ilmek yapısı, DD (ölüm motifi) ilmek yapısı ve α C-helix yapısı tüm TLR'lerde karakteristik olup sinyal iletimi için önemli yapısal motiflerdir (Şekil 14). TLR10 hücre içi BB-ilmek sinyal yüzeyi polar dizilerle sarılı merkezi hidrofobik özden oluşur. BB-ilmek yapısı çapraz BB-ilmek ve α C-helix yapılar tarafından paket şeklinde ardışık dizilerden meydana gelmiştir. Bu yapı, peptid substratların bağlanması için çok uygundur (Nyman ve Ark., 2008).

TLR1-TLR2 ve TLR10 konformasyonel açıdan birbirine benzer proteinlerdir. Bu grupta DD-ilmeğin ana zincir ve yan zincir konformasyonların

özelikle çok benzediği belirlenmiştir. TLR10 proteininde BB-ilmekte yer alan $\alpha\beta$ -heliks etkileşim yüzeyin ilk dizisi Ser-679'dır (Şekil 14).



Şekil 14- TLR10 TIR Dimer Yapısı.
(Monomer A ve Monomer B)

TLR 10 dimer, 947Å²'luk gömülü etkileşim yüzeyi iki katlı simetridir. Dimer yüzeyi, bir hidrojen bağı ağı tarafından sarılmış hidrofobik merkezden oluştuğu belirlenmiştir. Hidrofobik merkez şeklinde olan BB-ilmeğin dizileri Tyr-668, Phe-672, Pro-674 ve Ile-678 tarafından oluşturulur. Bu dört dizi dimer kontağının sağlamasının yanısıra dizi 667-678, BB-ilmeğin konformasyonunda kararlılığı sağlar. Merkezdeki α C-heliks in sonundaki Phe-710 ve Cys-706 hidrofobik etkileşimlere katkı sağlar. BB-ilmek (Tyr-668, Lys-676) , α B-heliks (Ser-679) ve merkezi α C-heliks (His-707) dizileri yüzey içeriğinin hidrofobik merkezi hidrojen bağı ağı ile sarılmıştır. Ser -679 ve His-707 dizileri hidrojen bağlarıyla Ser-His-His-Ser zinciri şeklinde formlanır ve dimerin en merkezine iki α C-heliks şeklinde bağlanır. Meydana gelen iki alt ünite (Şekil 14. Monomer A ve

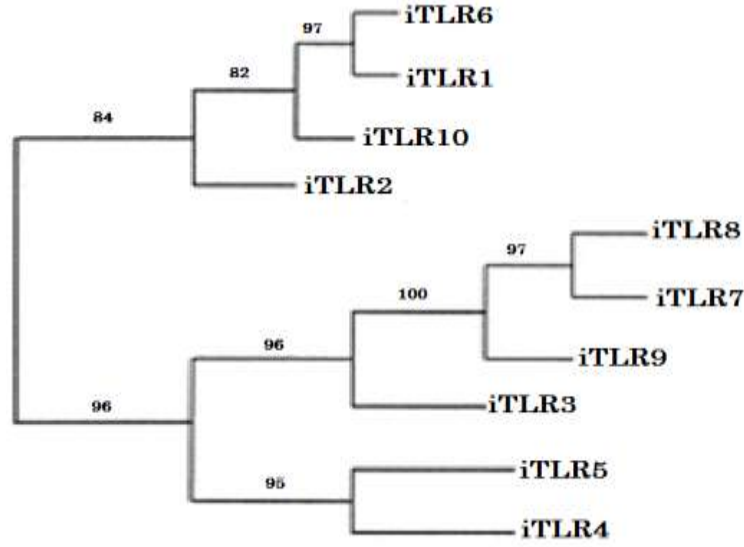
B şeklinde) arasında hidrojen bağları aracılığıyla çok sayıda su moleküllerinin bir yarık formu göze çarpar. Monomer A'daki yarığın en üstünde DD-ilmekte yer alan Arg-741'i, monomer B nin yapısındaki heliks αC 'deki Glu-709 ile polar bir etkileşim yapar. Monomer B'de ise, DD-ilmek yapısı düzensizdir ve Phe-735 ve Tyr-736 yan zincirleri yüzünden olduğu belirlenmiştir (Nyman ve Ark., 2008). Simetri bağlantısı kuran molekül BB-ilmeğine bağlanır. TLR10 yapısında, TLR ailesinin diğer üyelerinden önemli bir farklılığı BB-ilmeğinin pozisyonudur. BB ilmek, dimer yüzeyinin hacim olarak önemli bir kısmını oluşturmaya rağmen, asıl hacmin BB-ilmeğin büyük bir kısmını çevrelemiş çözücünden kaynaklandığı belirlenmiştir (Nyman ve Ark., 2008). BB ilmeğin bu özelliği yapısında bulunan dizilerin korunmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür (Nyman ve Ark., 2008). TLR işlevinde BB-ilmek dizileri, TIR içeren diğer adaptör moleküllerin bağlanması açısından önemlidir. Örneğin, TLR2 TIR domaninin BB ilmeğindeki C713S mutasyonu bu yapıda asimetric dimerin fizyolojik rolünün öneminin büyük olduğu belirlenmiştir. TLR2 yalnızca asimetric dimere sahip olmasından dolayı homodimer olarak iş göremeyeceği ve asimetric yüzey TLR1 ya da TLR6 ile heterodimer yapıyı oluşturduğu anlaşılmıştır. BB ilmekteki asimetric dimer yüzeyi ilişkili olduğu TIR içeren diğer adaptör monomerinde yer alan DD-ilmek ile αC heliks ve αB -heliks etkileşir. TLR1, disülfitle bağlanmış merkez bileşenler olarak αC -heliks ve BB-ilmekler ile simetric dimer oluşturur. TLR10 ise simetric ve asimetric formda iş görebilir. Bu özelliğinden dolayı TLR10 hem homodimer formu hemde TLR 1-2 ile etkileşerek heteromer formu oluşturur. TLR10 homodimerizasyon %100 bağlanma afinitesine, TLR1-10 % 87 bağlanma afinitesine ve TLR1-2 ise %80 bağlanma afinitesine sahiptir (Uzma ve Ark., 2005).

TLR ailesinde TIR motiflerinin işlevi için BB-ilmekleri ve DD-ilmekleri önemlidir. TLR10 TIR motifi de, birkaç TIR motifi içeren adaptör moleküllerle etkileşir. TLR10 sinyal iletimi için transkripsiyon faktör indüklemesiyle sonuçlanan MyD88 bağımlı sinyal iletim yolunu ve bunun yanında sinyalde TIRAP, TRIF ve TRAM görev alır. Aşağı sinyal iletimi için BB-ilmeklerindeki korunmuş prolinin önemi büyüktür. Pro-674 hem yüzey etkileşimini hem de onun

ana zincir konformasyonunu gererek BB ilmeğin spesifik konformasyonunu stabilize eder. Pro-674 dimer yüzeyinde yer almasından dolayı adaptör moleküllerle etkileşimin potansiyel olarak etkiler. TLR10 Ile-678 mutasyonuna sahip reseptörden sinyal iletimi olmadığı görülmüştür. TLR10 daki Ile-678, Pro-674 ve Phe-672 dizileri, TLR10 dimerindeki merkezi hidrofobik etkileşime tümüyle katılır. B-monomerdeki Phe-672 komşu alt üniteye Phe-672 ile homotipik etkileşim yaparak TLR10 homodimerizasyonunu sağlar (Şekil 14). Ile-678 tüm TLRlerde (TLR3 –Glu ve TLR5-Arg hariç) alifatik dizi olarak korunmuştur. TLR10'un Phe-710 ve Cys-706 dizileri, reseptör fonksiyonu için önemlidir. Bu iki dizi, TLR10 dimer arayüzünde direk olarak van der Waals etkileşimi yapar. TLR10 dimeri, çoğunlukla His-707, Cys-706 ve Phe-710 rezidülelerinden oluşmuştur (Şekil 14). TLR10 daki Arg-741, Tyr-742, Leu-745 ve Lys-746 dizilerinin, heterodimer etkileşimlerle TLR1-TLR2 sinyal iletimine önemli etkileri vardır. TLR10 arayüzünde Arg-741, Glu-709 ile bir tuz köprüsü kurar ve molekülün çekirdeği üzerinde DD-ilmeğin esnek olmasını sağlar (Nyman ve Ark., 2008).

TLR1, TLR6, TLR10 kromozom 4p14 üzerinde genel bir lokus paylaşır ve yapısal olarak herbiri birbirine benzerdir. TLR1-TLR2 ve TLR2-TLR6 fonksiyonel çiftleri dışmotifleri mikrobial dizilerin birçok çeşidini tanır. TLR10 ise TLR2'ye koreseptör olarak hareket eder. Benzer olarak TLR7-TLR9 ve TLR10 ifade profili B hücreleri ve plazmasitoid dentritik hücreler (PDCs) ile sınırlı olduğu rapor edilmiştir. Bazı patojenler tarafından B hücrelerinin uyarılması TLR9/TLR10 mRNA ifadesini yükselttiği ve TLR10'nun B hücreleri ve plazmasitoid dendritik hücreler (PDC) ler tarafından ifade edildiği belirlenmiştir (Bourke ve Ark., 2003).

Tüm insan TLR'leri arasında yapılan filogenetik analizlerde TLR10, TLR1 ve 6 ile yüksek oranda benzerlik gösterir (Şekil 15). Sekans homolojisine bakıldığında muhtemelen atasal TLR1/6/10, öncül TLR1-6 ve TLR10 üretmeye duplike olmuştur (Uzma ve Ark., 2005).



Şekil 15- İnsan TLR (hTLR) ailesi üyeleri arasındaki Evrimsel İlişki

TLR2 tarafından bakterilerden diaçil ve triaçil lipopeptidlerin tanımlanmasında ve ligandın verimli bir şekilde bağlamasında TLR1 ve 6 ile ilişkisi gereklidir. Potansiyel olarak TLR10 bu TLR'lerin koreseptörü olarak hareket ettiği düşünülmektedir (Uzma ve Ark., 2005). TLR'lerin homo- ve heterodimer formasyonla ilişkili non-TLR yüzeyleri; immün sistem modülasyonu ve ligand tanımlama için dimerizasyon potansiyelini artırarak, PAMP ların geniş sayıda tanımlanmasını sağlar. TLR10 agonistleri doğasının anlaşılması üzerine, ilkin TLR10 tek olarak sonrasında TLR 1,2,6 transfekte olarak NF- κ B'nin aktivasyonuna yönelik PAMP'larla TLR10 ligandının ilişkilendirilmesine yönelik çalışma sonucu NF- κ B indüklemesinde TLR10 aktif eden bakteriyel kökenli bileşikler açıkça belirlenememiştir (Uzma ve Ark.,2005). Bunun yanında, TLR7 ve 9'un aktivasyonu sonucu viral enfeksiyona cevap olarak TipI IFN'lerin yüksek seviyelerde üretilmesine neden olduğu, ancak TLR10 ligandının viral olduğuna dair kesin bir delile rastlanılamamıştır. Enfeksiyon (EBV, RSV, HIV ve diğer herpes virüsleri ve bakteriyel patojenlerin çoğunluğu) sonrası insan tonsillerinden izole edilen B hücreleri ve PDC'lerdeki TLR10 ifadesi geliştiği belirlenmiştir (Tanaka, 2001). Patojen indüklemesine bağlı olarak bu hücrelerin aktivasyonu TLR10 ligandıyla ilgili önemli ipuçları sunmaktadır. Muhtemelen TLR10 aşırı sınırlı ifade profiline sahip olduğu ve patojen kökenli çok spesifik molekülü

tanıldığı düşünülmektedir. İnsanlarda TLR7, 9 ve 10 üretimi granüositlerle özellikle eozinofillerle, oluşum fazında B hücreleri ve plazmasitoid dendritik hücrelerle (PDC) sınırlıdır. TLR7 ve 9 için PDC’lerde TipI IFN’nin uyarılması ya da B hücrelerinin aktivasyonu ya da CpG motiflerinin varlığında TLR9 için gözlenen sitokin sekresyonu TLR10’un fonksiyonu ya da ligandı açısından önemlidir (Bourke ve Ark.,2003).

İnsan TLR10, üç ekzona sahiptir ve açık okuma çerçeveleri tek bir ekzonda kodlanır. TLR10 gen yapısında belirlenen polimorfizmler ekson II bölgesinde rs4129009 (*L775V*), rs11466657 (*I473T*) , rs11466655 (*G381D*) , rs11096955³ (*I369L*) , rs11096956 (*P344P*) , rs11466653 (*M326T*) , rs11466651 (*V298I*), rs11096957³ (*N241H*), rs11466649 (*A163S*), rs10856838 (*I13I*) şeklindedir. İntronI bölgesinde rs4274855 (*G/A*), rs11466640 (*C/T*), rs11466617 (*A/G*), rs7653908 (*G/C*), rs7658893 (*G/A*) polimorfizmleri belirlenmiştir.

Günümüzde insan TLR10 polimorfizmleri birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. İnsan TLR10 rs4129009 (*I775V*), rs11096957 (*720 A/C*), rs11096955 (*I369L*) polimorfizmlerindeki homozigot mutant genotipin prostat kanser riskini azalttığı belirlenmiştir (Chen ve Ark., 2007). İnsan TLR6-1-10 haplotiplerin belirlemesi üzerine yapılan çalışmada prostat kanseriyle ilişkili bulunmuştur (Stevens ve Ark., 2008). Aynı haplotipler NHL (Non-Hodgkin Lymphoma) riskiyle de ilişkili bulunmuştur (Purdue ve Ark., 2009). İnsan TLR6-1-10 gen kümesinde sinonim olmayan polimorfizmler üzerine özellikle bazı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda tüberküloz hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (Ma ve Ark., 2007). İnsan TLR10 polimorfizmleri nazofaringal karsinoma ile ilişkilendirilmiştir (Zhou ve Ark., 2006). Lazarus ve Ark.(2004) *G1031T* ve *A2322G* TLR10 SNP’lerin Afrika kökenli Amerikalılar ve Avrupa kökenli Amerikalılar arasında iki farklı popülasyonunda astımla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışma ile bir Türk popülasyonunda ilk kez *TLR10* 2322 *A/G* (rs4129009), 720 *A/C* (rs11096957) ve 992 *T/A* (rs11466645) polimorfizimlerine ait alel sıklıklarını belirlemeyi ve bu SNP’lerin KKKA hastalığıyla ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2- MATERYAL METOD

2.1-Örneklerin Toplanması ve Saklanması:

Çalışma kapsamında aynı bölge de yaşayan rastgele seçilmiş sağlıklı kişilerden oluşan 157 bireylik kontrol grubu ile Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı tanısı konmuş 88 bireylik hasta grubu ile çalışıldı. Hasta grubuna ait kan örnekleri 2009 ve 2010 yılı içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakterioloji Anabilim Dalına hastalığı tespit edilen bireylerden alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak hasta ve kontrol grubuna ait kan örnekleri için Cumhuriyet Üniversitesi yerel etik kurulundan onay alınmıştır (Etik Kurul No: 2009-12/09).

Hastalığın tanısı için hasta kanından elde edilen serum örnekleri -70 °C saklandı. Akut ve iyileşmiş durumdaki hastalardan serum örnekleri serolojik ve virolojik analizler için Ankara’da bulunan Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Viroloji Laboratuvarına gönderildi. KKKA enfeksiyon tanısı için tipik klinik ve epidemiyolojik bulgular temel alındı. ELİSA testi ile KKKA virüse özgü IgM belirlendi ve RT-PZR (Real-Time) ile KKKA virüsün genomik segmenti belirlendi. Hastaların %50 bireyi KKKA virüse özgü antijen ile %15,9’u RT-PZR ve %34,1 birey ise her iki teste pozitif sonuç vermiştir. Hasta grubunun 13 bireyi KKKA Hastalığından dolayı hayatını kaybetmiş bireylerden oluşmaktadır.

2.2. DNA izolasyonu:

Bireylerden total genomik DNA izolasyonu Sambrook ve ark., (1989) tarafından tanımlanan standart fenol-kloroform protokolünde bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek uygulandı. EDTA’lı tüplerde saklanan kan örneklerinden 400µl hacimde örnek 1.5ml’lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerlerine eklenen 400µl STE homojenizasyon tamponu (0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.05 M Tris HCl (pH 8), 10% SDS) ile süspanse edildi. 50 µg/ml konsantrasyona sahip olacak şekilde proteinaz K eklendi ve 55°C’de belirli aralıklarla karıştırmak üzere 2-3 saat inkübasyona bırakıldı. Ekstraksiyon sonrası ekstraktlara iki kez bir hacim fenol, bir hacim kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ekstraksiyonu ve bir kez daha kloroform-izoamil alkol (24:1) ekstraksiyonu uygulandıktan sonra alkol presipitasyonu yapılarak elde edilen genomik DNA

1^xTE (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) tamponunda çözülerek -20°C’de saklandı.

2.3.Genomik DNA’nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

Bireylerden izole edilen DNA örneklerinden 5µl alınarak, aşağıda açıklandığı gibi, %1’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak etidyum bromid ile boyandı. İzole edilen DNA numuneleri kalite açısından (izolasyon sırasında hasar görüp görmediği) incelendi.

İzole edilen DNA’nın konsantrasyonu, spektrofotometre ile 260 nm’de absorbansları okunarak belirlendi. Stok DNA örneklerinden 20 µl alınarak 980 µl distile su ilave edilip 50 kat seyreltildikten sonra kuvartz küvetlerde konup spektrofotometrede absorbansı ölçüldü. Ayrıca stok DNA’nın 280 nm’de absorbansı ölçülerek protein kontaminasyonu olup olmadığı test edildi. İzole edilen DNA’nın konsantrasyonunu belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

DNA (µg/ml)= 260 nm’deki OD (absorbans) X Sulandırma oranı X 50

Bir absorbans 50 µg/ml çift iplikçikli DNA’ya karşılıktır.

2.4- Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürününden yaklaşık 5µl alınarak, 1µl yükleme tamponu (6X) (%50 gliserol, 0.1 M EDTA, %SDS, %0.1 bromfenol mavisi, Xylen siyanol) ile karıştırıldı. TBE tamponu içerisindeki (0,089 M Tris, 0,089 M Borik Asit ve 0,011 M EDTA, pH:8.3) %1,5’luk agaroz jelde ayrıştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında, 10X TBE, distile su, 0,5µg/ml etidiyum bromid ve agaroz (sigma) kullanıldı. Elektroforezden sonra, DNA Ultra Viyole ışığı altında görüntülendi ve PZR ürünleri kontrol edildi.

2.5- PZR Amplifikasyonu

Çalışma kapsamında TLR10 gen bölgesine ait 2322 A/G (rs4129009), 720 A/C (rs11096957) ve 992 T/A (rs11466645) üç polimorfik bölge çalışıldı. Bu gen bölgesi Tablo 3’te listesi verilen primer çiftleri ve bağlanma sıcaklıkları kullanılarak amplifiye edildi. PZR reaksiyonları 25µl son hacimde, 100 ng kalıp genomik DNA, 0.1 mM dNTP, 3,5 mM MgCl₂, TLR10 primerlerinden 5’er pmol ve 0.25 U Taq DNA polimeraz bulunacak şekilde hazırlanmıştır. PZR: 95°C’de 5

dakika bir denatürasyon adımı; 35 döngüden oluşan üç amplifikasyon adımı: (1) denatürasyon; 95°C’de 45 saniye, (2) bağlanma; farklı polimorfizmlere ilişkin bağlanma sıcaklıkları Tablo1’de verilmiştir. 45 saniye ve (3) Uzama; 72 °C’ de 30 saniye; final uzama; 72°C’ de 5 dakika 35 döngüden oluşan bir reaksiyonla gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri % 1’lik agaroz jel üzerinde görüntülendi.

Tablo3- TLR10 SNP lerine ait primerler, bağlanma sıcaklıkları ve restriksiyon enzimleri.

Gen	SNP	Primerler (Forward/Reverse)	Bağlanma Sıcaklığı(°C)	Restriksiyon Enzimleri
TLR 10	2322 A/G rs 4129009	5'CCAGAATGAGTGGTGCCATT 3' 5'GTATGTGGTCCCCAACTTCCC3'	56	<i>VspI</i>
	720 A/C rs11096957	5'AGAAGGTAGCCTGCCCATC3' 5'TCGGATCTGAAAGTGTTCCA3'	59	<i>Hin1II</i>
	992 T/A rs11466645	5'GATGAGGAAATTGAAGGATCT3' 5'CACTGCTACTTCCCCAGTGC3'	54.2	<i>XbaI</i>

2.6- RFLP Reaksiyonu

TLR10’da çalışılan polimorfizmlerde bireylerin genotipleri PZR’ye dayalı RFLP (Restriksiyon -kesim- parçası uzunluk polimorfizmi) metoduyla belirlenmiştir. Üç farklı polimorfizm için farklı enzimlerin kullanıldığı Restriksiyon kesim şartları aşağıdaki gibidir.

Restriksiyon sindirim

- Distile su : 3,5 µl
- Enzim : 1 µl
- Rest. Enzim : 0,5 µl
- PZR ürünü : 5 µl
- Toplam hacim : 10 µl

TLR10 lokusu 2322 A/G polimorfizmini belirlemek üzere *VspI* (10U/µl, Vibrio türleri) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Enzim tamponu (Tris-asetat pH: 7,9, 10mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1mg/ml BSA, Fermentas) 10 katı konsantrasyonda kullanıldı.

VspI enziminin tanıma dizisi aşağıdaki gibidir:

5'...AT⁺TAAT...3'

3'...TAAT⁺TA...5'

TLR10 lokusu 720 A/C polimorfizmini belirlemek üzere *Hin1II* (10U/μl, *Haemophilus influenzae*) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Enzim tamponu (Tris-asetat pH: 7,9, 10mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1mg/ml BSA, Fermentas) 10 katı konsantrasyonda kullanıldı.

Hin1II enziminin tanıma dizisi aşağıdaki gibidir:

5'... N⁺CATGN...3'

3'... NGTAC⁺N...5'

TLR10 lokusu ile 992 T/A polimorfizmini belirlemek üzere *XbaI* (10U/μl, *Xanthomonas badrii*) restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Enzim tamponu (Tris-asetat pH: 7,9, 10mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1mg/ml BSA, Fermentas) 10 katı konsantrasyonda kullanıldı.

XbaI enziminin tanıma dizisi aşağıdaki gibidir:

5'...T⁺CTAGA... 3'

3'...AGATC⁺T...5'

2.7- Sekans Analizi

RFLP sonucu belirlenen genotipleri doğrulamak amacıyla farklı genotipe sahip (yabanıl, heterozigot ve varyant genotip) bireylere ait örneklerin %5'i sekans analizi yaptırılmıştır. Sekans analizi sayesinde RFLP sonucu oluşması muhtemel kısmi sindirim riski elimine edilmiştir. Bu çalışmada jelden DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak PZR ürünleri saflaştırılmıştır (AXYGEN). Farklı genotipteki PZR ürünleri %1 lik agaroz jelde yürütüldü. Jeldeki her örneğe ait bantlar UV altında bir bistüri ile kesildi ve temiz bir zeminde küçük parçalara ayırarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Her bir tüp hassas terazide darası

alınarak jel parçalarının ağırlıkları ölçüldü. Jelden DNA İzolasyonu için AXYGEN'in DNA jel ekstrasyon Spin Protokolü kullanıldı.

PZR bantının olduğu jel parçası tüpe yerleştirildi. Hacmi belirlenen her bir tüp içersindeki jel parçaları üzerine her hacmin 3 katı kadar Tampon DE-A (Jel çözücü) eklendi. Her bir tüp süspanse hale gelene kadar vortekslendi. Her bir tüp 6-8 dak 75° C'ye kadar ısıtılarak jelin tamamıyla çözülmesi sağlandı. Her 2-3 dakikada bir hafifçe tüp vortekslendi ve jelin çözünmesi hızlandırıldı. Kullanılan Tampon DE-A'nın yarı hacminde Tampon DE-B (Bağlayıcı Tampon) eklendi. Örnek hacmi kadar 1x izopropanol eklendi. Ependorf tüplere filtrasyon sütunu yerleştirildi ve 1 dak 15 000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Sonra tekrar filtrasyon sütunu yerleştirildi ve üzerine 500µl Tampon W1 (Yıkama Tamponu) eklendi. 15 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkarılarak tüp dibindeki sıvı pipetle alındı ve sütun tekrar yerleştirildi. Üzerine 700µl Tampon W2 (Desalinize Tampon) eklendi ve 15000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Filtrasyon sütunu yerleştirdikten sonra bir kez daha 700µl Tampon W2 eklendi ve bu kez 15000 rpm'de 1 dak santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartıldı ve tüpün dibine inen sıvı pipetle alındı. Sonra tekrar filtrasyon sütunu yerleştirildi. Tüp bir kez daha 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve filtrasyon sütunu 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 65° C'de 1 dakika bekletilen çözücünden 30 µl alarak tüpe eklendi. Daha sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi ve 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtrasyon sütunu çıkartılarak, tüpün dibine inen çözünmüş DNA'nın 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Fotoğrafı çekildi ve 25 µl lik çözünmüş DNA örnekleri primerleriyle birlikte dizilemeye gönderildi.

Çalışmamızda RFLP yöntemiyle belirlediğimiz genotipler ile sekans analiz sonuçları uyumludur.

Buna göre ;

2322 A/G polimorfizmi için eksonII'de 370bç lik bölgede 221. pozisyonda A→G baz değişimi belirlendi.

```
CCAGAATGAGTGGTGCCATTATGAATTCTACTTTGCCCACCACAATCTCTTCCATGAA
A ATTCTGATCATATAATTCTTATCTTACTGGAACCCATTCCATTCTATTGCATTCCCAC
CAGGTATCATAACTGAAAGCTCTCCTGGAAAAAAGCATACTTGGAATGGCCCAA
GGATAGGCGTAAATGTGGGCTTTTCTGGGCAAACCTTCGAGCTGCT
A/GTTAATGTTAATGTATTAGCCACCAGAGAAATGTATGAACTGCAGACATTACAGA
GTTAAATGAAGAGTCTCGAGGTTCTACAATCTCTCTGATGAGAACAGATTGTCTATAA
AATCCCACAGTCC TTGGGAAGTTGGGGACCACAT
```

720 A/C polimorfizmi için ekzonII'de 290bç'lik bölgede 175. pozisyonda A→C baz değişimi belirlendi.

```
TCGGATCTGAAAGTGTCCACTGATGTATGCCAAACAAATTGTAAGATAAGGAAAAG
GTCGTCCCAGAGTAAATCAACTTTATTAAGCAATAGAACCGATGTCTTAGCATTTTCT
AAACTAAGATTTTCGTTGCATTTCATAACTTACAAATTGGCTTTTGCCATCTATATTTGT
C/AATTTCTAATATTTTGAAGTCTTGATTCCATCACGCAAAAGAACCCAGAAATTTGT
GTCCATTGG TAAAACAATGTGCAGTTTTGTTGTGTTTAAGATGGGCAGGCTACCTTCT
```

A-992T polimorfizmi için intronI'de 195bç'lik bölgede 134. pozisyonda T→A baz değişimi belirlendi.

```
GATGAGGAAATTGAAGGATATTGAAGGATATAGAATTCTGAGGACTTTGGGAGATGT
GCCAGGCTTCACGTGGTTGGATTAGACGTAGAACAGAGGTAGTTGGAGTACTAAGAT
TTTACGATATTCATTATTC
A/TAGATATTTATTAAGTACCTATTCTGCCAGAACTTTTCTAGGCACTGGGGAAGTAG
CAGTG
```

2.8- İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS (13.0) ve POPGEN (1.31) programları kullanılarak yapıldı. TLR10 genotiplerinin hasta ve kontroller arasındaki istatistiksel önemi ve risk katsayısı (OR) Pearson'un χ^2 testi kullanılarak hesaplandı. Olasılık değeri (p) 0,05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg analizi POPGEN (1.31) istatistik programı kullanılarak yapıldı.

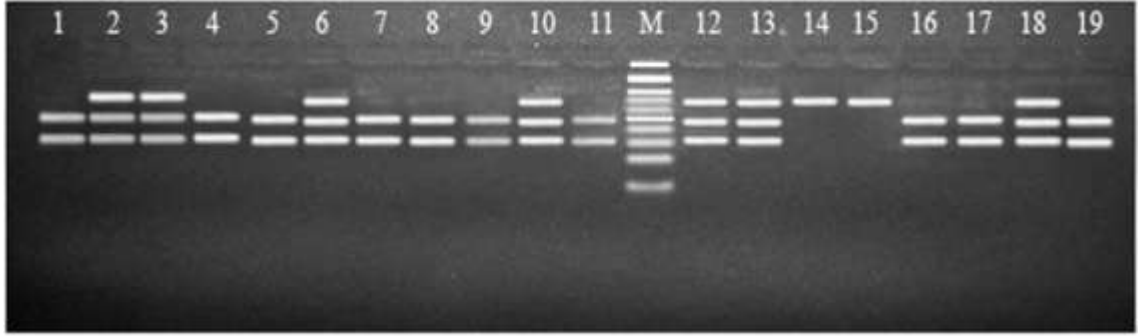
3-BULGULAR

Çalışmamız tanısı kesinleşmiş 88 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hasta grubu ile 157 sağlıklı kontrol grubu ile yapıldı. Hasta grubu 46 erkek ve 42 kadın bireyden, kontrol grubu ise 85 erkek ve 72 kadın bireyden oluşmaktadır. (Tablo 4) Hasta ve kontrol grubu arasında cinsiyete bağlı dağılımda istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p:0,079$; $OR=1.07$; $\%95CI=0.63-1.81$). Hasta grubundaki bireylerin yaş ortalaması 42.3 ± 17.2 , kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması ise 46.05 ± 12.8 'dir (Tablo 4). Hasta ve kontrol grubu arasında yaşa bağlı dağılımda da istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p:0,708$; $OR= 0,90$; $\%95 CI= 0,52-1,54$). 88 hastanın 13 bireyi fataldir (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta ve Kontrol popülasyonlarına ait demografik bilgiler

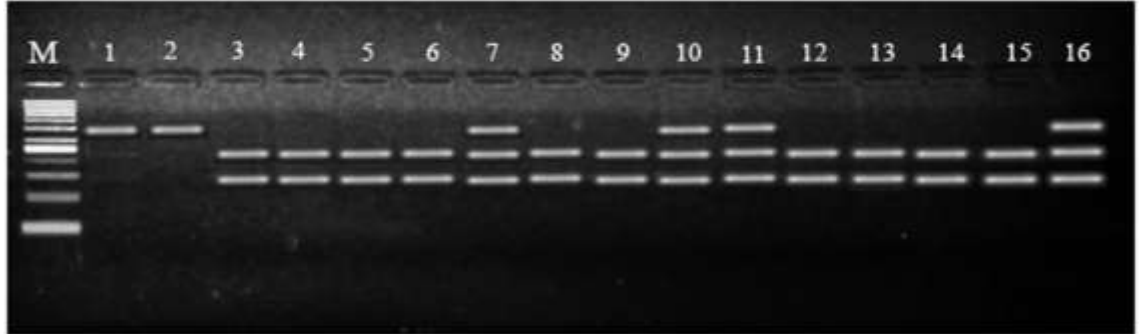
	HASTA		KONTROL		<i>p</i> -değeri	OR (%95CI)
	N	%	N	%		
Örnek Büyüklüğü	88		157			
Cinsiyet						
Erkek	46	52,2	85	54,1		
Kadın	42	47,8	72	45,9	0,779	1.07 (0.63-1.81)
Yaş						
Aralık	30-65		25-65			
Ortalama $\pm$ SD	46.05 $\pm$ 12.8		42.3 $\pm$ 17.2			
Erkek	45.0		43.1			
Kadın	47.1		41.5		0,708	0,90 (0,52-1,54)
Fatal Birey Sayısı	13					

TLR10 2322 A/G Polimorfizmini belirlemek amacıyla RFLP reaksiyonunda *VspI* enzimi kullanılmıştır. PZR ile 370bp'lik fragment çoğaltılmıştır. PZR ürünü *VspI* ile kesim sonucu GG genotipinde *VspI*'in tanıma bölgesi olmaması nedeniyle 370bp'lik fragment oluşmaktadır. GA genotipinde 370bp, 220bp, 150bp ve AA genotipinde 220bp, 150bp fragmentler oluşmaktadır (Şekil 16).



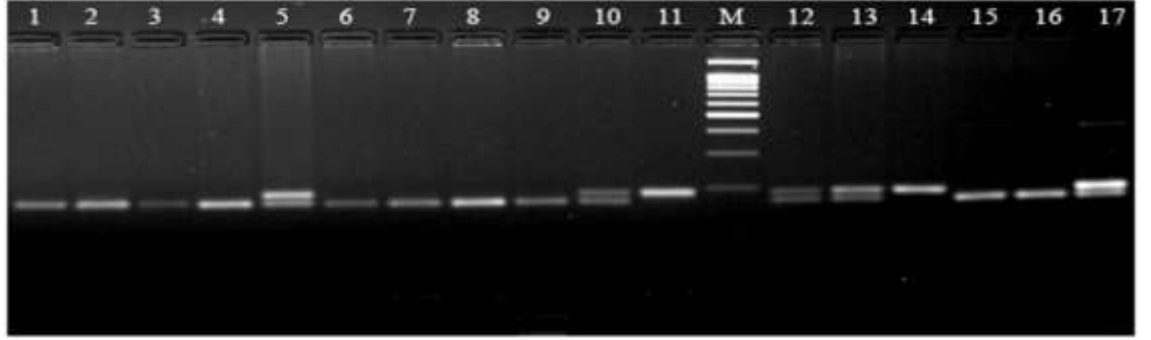
Şekil 16- *TLR10* 2322 A/G polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü. GG genotip 370bç (sıra: 14,15),GA genotipi 370bç, 220bç,150bç (sıra: 2,3,6,10,12,13,18) ve AA genotipi 220bç, 150bç (sıra: 1,4,5,7,8,9,11,15,16,17,19). Marker 50bç.(Fermentas)

TLR10 720 A/C Polimorfizmini belirlemek amacıyla RFLP reaksiyonunda *Hin1III* enzimi kullanılmıştır. PZR ile çoğaltılan 290bç'lik fragment *Hin1III* ile kesim sonucunda AA genotipi *Hin1III*'in tanıma bölgesi olmaması nedeniyle 290bç'lik fragment gözlenmektedir. AC genotipinde 290bç, 175bç, 115bç ve CC genotipinde 175bç, 115bç fragmentler oluşmaktadır (Şekil 17).



Şekil 17- *TLR10* 720 A/C polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü. AA genotip 290bç (sıra: 1,2), AC genotipi 290bç, 175bç, 115bç (sıra: 7,10,11,16) ve CC genotipi 175bç, 115bç (sıra: 3,4,5,6,8,9,12,13,14,15). Marker 50bç.(Fermentas)

TLR10 992 T/A Polimorfizmini belirlemek amacıyla RFLP reaksiyonunda *XbaI* enzimi kullanılmıştır. PZR ile 195bç fragment çoğaltılmış, PZR ürünü *XbaI* ile kesim sonucu AA genotipi *XbaI*'in tanıma bölgesi olmaması nedeniyle 195bç'lik fragment oluşur. AT genotipinde 195bç,138bç,57bç ve TT genotipinde 138bç, 57bç fragmentler oluşmaktadır (Şekil 18).



Şekil 18- *TLR10* 992 T/A polimorfizmi için PZR-RFLP jel görüntüsü. AA genotip 195bç (sıra: 11,14), AT genotipi 195bç, 138bç, 57bç (sıra: 5,10,12,13,17) ve TT genotipi 138bç, 57bç (sıra: 1,2,3,4,6,7,8,9,15,16). Marker 50bç.(Fermentas)

Hasta ve kontrol popülasyonlarında *TLR10* polimorfizmlerinin alel frekans dağılımları Tablo 5’te sunulmuştur. 2322 A/G polimorfizmi için A alel frekansı kontrol grubunda %71,4 ve hasta grubunda %77,2 dir. G alel frekansı dağılımı kontrol grubunda %28,6 ve hasta grubunda ise %22,8’dir. KKKA hasta ve kontrol bireyler arasında alel frekansı dağılımlarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yoktur ($p= 0.153$). *TLR10* 720 A/C polimorfizminde ise A aleli kontrol grubunda %52,3 ve hasta grubunda %64,2 dir. C alel frekansı dağılımı kontrol grubunda %47,7 iken hasta grubunda ise %35,8’dir. KKKA hastalarında *TLR10* 720 A/C Polimorfizminde alel A frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p=0.010$). *TLR10* 992 T/A polimorfizmi için A aleli frekansı kontrol grubunda %25,1 ve hasta grubunda %27,3 dir. T aleli frekans dağılımı kontrol grubunda %74,9, hasta grubunda ise %72,7dir. KKKA hasta ve kontrol bireyler arasında alel dağılımında istatistiksel olarak önemli farklılık yoktur ($p=0,608$).

Tablo 5. Hasta ve Kontrol popülasyonlarında *TLR10* Polimorfizmi için alel frekansı dağılımları

	Kontrol	Hasta	χ^2	
Polimorfizim	N %	N %		p -değeri
<i>2322 A/G</i>				
A	224 (71,4)	136 (77,2)	2,038	0,153
G	90 (28,6)	40 (22,8)		
<i>720 A/C</i>				
A	164 (52,3)	113 (64,2)	6,582	0,010
C	150 (47,7)	63 (35,8)		

992 T/A				
A	79 (25,1)	48(27,3)		
T	235 (74,9)	128 (72,7)	0,262	0,608

TLR10 2322 A/G polimorfizminde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunamamıştır ($p= 0,261$). Bu polimorfizmde hasta grubu Hardy-Weinberg dengesinde iken ($p= 0,740$) kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesinde değildir ($p= 0,015$) (Tablo 6).

TLR10 720 A/C polimorfizminde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p= 0,023$). *TLR10 720 A/C* polimorfizminde hasta ($p= 0,142$) ve kontrol ($p=0,429$) gruplarının genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesindedir (Tablo 6).

TLR10 992 T/A polimorfizminde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunamamıştır ($p= 0,213$). *TLR10 992 T/A* polimorfizminde kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesinde iken ($p= 0,720$), hasta grubu Hardy-Weinberg dengesinde değildir ($p= 0,022$) (Tablo 6).

Tablo 6.Hasta ve Kontrol populasyonlarında TLR10 polimorfizmi için genotip frekansı dağılımları

Polimorfizim	Kontrol N %	Hasta N %	χ^2	p-değeri
<i>2322 A/G</i>				
AA	86 (54,7)	53 (60,2)		
AG	52 (33,1)	30 (34,2)		
GG	19 (12,2)	5 (5,6)	2,684	0,261
χ^2	5,881	0,109		
p-değeri*	0,015	0,740		
<i>720 A/C</i>				
AA	40 (25,4)	33 (37,5)		
AC	84 (53,5)	47 (53,4)		
CC	33 (21,1)	8 (9,1)	7,530	0,023
χ^2	0,624	2,152		
p-değeri*	0,429	0,142		
<i>992 T/A</i>				
TT	87 (55,5)	50 (56,8)		
AT	61(38,8)	28 (31,6)		
AA	9 (5,7)	10 (11,6)	3,094	0,213

χ^2	0,128	5,187
<i>p</i> -değeri*	0,720	0,022

*Hardy Weinberg analizi için *p* değeri

Hasta ve kontrol populasyonları arasında *TLR10* polimorfizmlerinin genotip dağılımına bağlı hastalık için risk tahminleri Tablo 7’de verilmiştir.

TLR10 2322 A/G polimorfizminin tüm genotip karşılaştırmalarında hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunamamıştır. Hasta ve kontrol arasında *TLR10* 2322 A/G polimorfizmi AA genotipinin, AG ile karşılaştırılması sonucu 0,819, GG genotipiyle karşılaştırılması sonucu 0,102 ve AG+GG genotipiyle karşılaştırılması sonucu 0,40 olarak *p* değeri elde edilmiştir (Tablo 7).

TLR10 720 A/C polimorfizminde AA genotipinin AC genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki elde edilemezken ($p=0,191$, OR= 0,67; %95 Cl=0,37-1,21), CC genotipi ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p= 0,006$, OR= 0,29; %95Cl = 0,12-0,72). Ayrıca AA genotipinin AC+CC genotip kombinasyonu ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($p= 0,048$, OR=0,57; %95Cl= 0,32-0,99) (Tablo 7).

TLR10 992 T/A polimorfizminde TT genotipinin AA genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilememesine rağmen AA genotipine sahip bireyler 1,93 kat daha yüksek risk grubunda olduğu tespit edilmiştir ($p= 0,175$, OR= 1,93; %95Cl= 0,73-5,07). Ayrıca TT genotipinin hem TA hem de TA+AA genotip kombinasyonu ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak önemli bir ilişki tespit edilememiştir (TA için $p= 0,437$, OR= 0,79; %95 Cl= 0,45-1,40; TA+TT için $p= 0,83$, %95Cl= 0,55-1,59) (Tablo 7).

Tablo 7. Hasta ve Kontrol popülasyonları TLR10 Polimorfizmi için genotip frekansı ve risk değerleri

Polimorfizim	Kontrol N %	Hasta N %	χ^2	p-değeri	OR (%95Cl)
2322 A/G					
AA	86 (54,7)	53 (60,2)	ref		
AG	52 (33,1)	30 (34,2)	0,05	0,819	0,93 (0,53-1,64)
GG	19 (12,2)	5 (5,6)	2,67	0,102	0,42 (0,15-1,21)
AG+GG	71	35	0,68	0,400	0,80 (0,47-1,35)
720 A/C					
AA	40 (25,4)	33 (37,5)	ref		
AC	84 (53,5)	47 (53,4)	1,71	0,191	0,67(0,37-1,21)
CC	33 (21,1)	8 (9,1)	7,52	0,006	0,29(0,12-0,72)
AC+CC	117 (74,6)	55 (62,5)	3,89	0,048	0,57(0,32-0,99)
992 T/A					
TT	87 (55,5)	50 (56,8)	ref		
TA	61(38,8)	28 (31,6)	0,60	0,437	0,79 (0,45-1,40)
AA	9 (5,7)	10 (11,6)	1,83	0,175	1,93 (0,73-5,07)
AT+TT	70	38	0,04	0,830	0,94 (0,55-1,59)

Erkek hasta ve kontrol popülasyonları arasında *TLR10* 2322 A/G polimorfizmi açısından tüm genotiplerde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilememiştir (AG için $p = 0,343$, OR= 0,68; %95Cl= 0,31-1,50, GG için $p = 0,083$, OR= 0,26; %95Cl= 0,05-1,29, AG+GG için $p = 0,116$, OR= 0,57; %95Cl= 0,27-1,20) (Tablo 8).

Erkek hasta ve kontrol popülasyonları arasında *TLR10* 720 A/C polimorfizmi açısından AA genotipinin CC genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,004$, OR= 0,12 ; %Cl= 0,02-0,58) (Tablo 8). Bu polimorfizmin AA genotipinin AC ve AC+CC genotipleri karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (AC için $p = 0,601$, OR= 0,81; %95Cl= 0,36-1,7, AC+CC için $p = 0,155$, OR= 0,57; %95Cl= 0,27-1,23).

Erkek hasta ve kontrol popülasyonları arasında *TLR10* 992 T/A polimorfizminde AA genotipi taşıyan bireyler 1,35 kat riske sahipken, tüm genotip

karşılaştırılmalarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (*TA* için $p=0,226$, $OR=0,60$; %95Cl= 0,27-1,36, *AA* için $p=0,643$, $OR=1,35$; %95Cl= 0,37-4,80, *TA+AA* için $p=0,391$, $OR=0,72$; %95Cl= 0,34-1,80) (Tablo 8).

Tablo 8. Erkek Hasta ve Kontrol popülasyonlarında *TLR10* genotipleri arasındaki risk değerleri

Polimorfizm	Kontrol N %	Hasta N %	χ^2	p -değeri	p^* -değeri	OR (%95Cl)
<i>2322 A/G</i>						
AA	44 (52,7)	30 (65,3)	ref			
AG	30 (35,2)	14 (30,4)	0,89	0,343		0,68 (0,31-1,50)
GG	11(12,1)	2 (4,3)	3,00	0,083	0,073	0,26(0,05-1,29)
AG+GG	41(47,3)	16 (34,7)	2,46	0,116		0,57(0,27-1,20)
<i>720 A/C</i>						
AA	23(27,1)	18(39,1)	ref			
AC	41(48,2)	26 (56,5)	0,27	0,601		0,81(0,36-1,7)
CC	21(24,7)	2 (4,4)	8,50	0,004	0,003	0,12(0,02-0,58)
AC+CC	62 (72,9)	28 (60,9)	2,02	0,155		0,57(0,27-1,23)
<i>992 T/A</i>						
TT	47(55,3)	29 (63,1)	ref			
TA	32(37,6)	12 (26,1)	1,46	0,226		0,60 (0,27-1,36)
AA	6 (7,1)	5 (10,8)	0,21	0,643		1,35 (0,37-4,80)
TA+TT	38(44,7)	17 (36,9)	0,73	0,391		0,72 (0,34-1,80)

* Fisher exact testi için p değeri

Kadın hasta ve kontrol bireyleri arasında *TLR10 2322 A/G* polimorfizminde *AG* genotipi taşıyan bireyler 1,32, *AG+GG* genotip kombinasyonu ise 1,15 kat riske sahipken, tüm genotip karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (*AG* için $p=0,497$, $OR=1,32$; %95Cl= 0,58-3,01, *GG* için $p=0,600$, $OR=0,68$; %95Cl= 0,16-2,83, *AG+GG* için $p=0,710$, $OR=1,15$; %95Cl= 0,53-2,49) (Tablo 9).

Kadınlarda *TLR10 720 A/C* polimorfizmi açısından hasta ve kontrol bireyler arasındaki tüm genotip karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (*AC* için $p=0,294$, $OR=0,63$; %95Cl= 0,26-1,49, *CC* için $p=0,265$ $OR=0,51$; %95Cl= 0,15-1,66, *AC+CC* için $p=0,224$, $OR=0,60$ %95Cl= 0,26-1,37) (Tablo 9).

4- TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışma bir Türk popülasyonunda ilk kez KKKA ile *TLR10* gen polimorfizmleri arasında ilişkinin araştırılması üzerinedir. KKKA kene üzerinde taşınan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün neden olduğu ve enfeksiyonun klinik seyri bazı bireylerde hafif bulgular bazılarında ise mortalite ile sonuçlanan bir hastalıktır. Türkiye’de 8 farklı bölgedeki KKKA hastaları arasında yapılan çalışmada virüs suşlarının benzer gruplar olduğu belirlenmiştir (Midilli ve Ark., 2007). Bu benzer suşların bazı hastalarda hafif septomlara neden olurken bazı hastalarda ölümle sonuçlanmasının nedenleri bugünkü bilgimizle tam olarak açıklanamamaktadır.

Bireylerdeki bağışıklık sisteminde etkili olan genlerdeki tek nükleotid polimorfizmleri bağışık cevabın farklı oluşmasında etkili olabilir. Ancak birçok farklı tek nükleotid polimorfizminin içerisinde hangisinin ilgili hastalıkla ilişkili olabileceğinin belirlenmesi şu ana kadar yapılan tüm çalışmalardaki en büyük güçlüklerdir. Kişiyeye özgü tedavi olanaklarının gerçekleştirilebilmesi bilim insanlarının yeteri kadar güvenilir ve polimorfik bölgeleri hastalıklarla ilişkilendirebilen bir veri tabanı oluşturmaya bağlıdır. Son yıllarda genetik polimorfizmlerin herhangi bir hastalığa yatkınlık derecesinin tesbiti ve tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önemli olduğunun anlaşılması, bu alandaki bilimsel çalışmaları arttırmıştır.

Bir polimorfizmin etkisi o polimorfizmin yerleşimine bağlıdır. Genin kodlanan bölgesinde, yani eksonunda meydana gelen farklılıklar protein dizisini etkileyebileceğinden proteinin yapısı ve fonksiyonu değişebilir. Ayrıca proteini kodlayan bölgelerin dışında, genin düzenleyici bölgede veya intron dizilerinde de nükleotid değişiklikleri gözlenebilir. Genin promotor bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için uygun DNA motifleri vardır. Bu bölgede meydana gelen polimorfizmler transkripsiyon faktörlerinin bağlanmalarını veya bağlanma etkinliklerini değiştirebilir. Böylece genin transkripsiyon aktivitesi artabilir veya azalabilir. mRNA kopyasının kalıcılığı ve dayanıklılığını ise 3'UTR bölgesi

etkiler. Bu bölgedeki polimorfizmler, mRNA kalıcılığını düzenleyen proteinlerin mRNA'ya bağlanmasını etkileyebilir ve sentez edilen protein miktarının değişmesine neden olabilir. Polimorfizm ve hastalık ilişkisini araştıran çalışmalarda kullanılan hasta ve kontrol grubunun etnik kökeni önemlidir. Çünkü genetik çeşitlilik, farklı etnik gruplarda farklı allel frekanslarının ve farklı hastalık risklerinin ortaya çıkmasına neden olur. Dolayısıyla oluşan polimorfizmlerin hastalık üzerindeki etkileri de çalışma grubunun etnik kökenine göre değişebilir.

Tek nükleotid polimorfizmleri bireylerin hastalığa karşı hassasiyetinin anlaşılması, ilaçlara duyarlılığı ve yan etkiler gibi konularda, hastanın genotipine göre bireysel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. KKKA hastalarındaki klinik sonuçların farklı olması nedeniyle bireylerin immün sistem gen polimorfizmi dikkat çekicidir.

Memelilerde doğal immunitenin aktivasyonunu takiben spesifik T ve B lenfosit klonal seçilimi ile karakterize adaptif immunitenin aktivasyonu izler. Adaptif immunitenin aktivasyonu için bilgiler çoğunlukla dendritik hücrelerle (DC) sağlanmıştır. Periferdeki olgunlaşmamış DC'ler endositoz için yüksek kapasiteye sahiptirler. Olgunlaşmamış DC'ler mikrobiyal komponentler tarafından aktive edilir ve olgun hale gelir. Olgun DC'ler endositoz kapasitesini kaybeder, hücre hatlarına göç eder ve burada naif T lenfositleri ile etkileşip adaptif immün yanıtı başlatır.

TLR ler TipI zar kat eden hücreleridir ve hücre zarında ya da hücre içi kompartımanlarda bulunur. TLR ler bakterilerden virüslere geniş çapta patojen tanır. Onlar hücre içi adaptör proteinlerle etkileşerek transkripsiyon faktörleri aktif ederler. İnflamatuvar sitokinlerin ve sonrasında adaptif immünitenin aktivasyonuna yol açarlar. KKKA enfeksiyonuna benzer olan kanamalı ateşlerin TLR leri farklı yollarla aktif ettiği belirlenmiştir. Okumura ve Ark.(2009) ebola virüsünün TLR4 sinyal yolunu uyardığını belirlemişlerdir. KKKA enfeksiyonuyla TLR aracılı immün cevap uyarılması hakkında kesin bir kanıt yoktur. Engin ve Ark. (2010) TLR 8 (*Met1Val* ve *-129C/G*) ve TLR9 (*-1486T/C*) polimorfizmlerin KKKA

hastalığının klinik tablosunda etkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak bu SNP ler TLR8-9 protein ifadesini ve fonksiyonunu ne şekilde etkilediği bilinmemektedir. Arslan ve Ark. (yayınlanmamış veri) KKKA hastalarında *NF-κB* 94D ve *NF-κB* 3'UTR G alellerinin bir risk faktörü olabileceğini belirlemişlerdir.

TLR1, TLR2 ve TLR5'in ekspresyonu olgunlaşmamış DC'lerde gözlenir, fakat DC'ler olgunlaştığında azalır. TLR3 ve TLR10 ise yalnızca olgun DC'lerde eksprese edilir. Ayrıca LPS, CpG DNA, lipoprotein ve mikobakterilerin hücre duvar iskeleti gibi çeşitli bakteriyel komponentlerin TLR aracılığıyla DC'lerin olgunlaşması için indüklediği belirlenmiştir. Bu bulgulardan hareket edilerek, TLR'lerin DC'lerin olgunlaşmasında kritik yer aldığı ve adaptif immunitenin aktivasyonunu başlattığı düşünülmektedir (Schreibelt ve Ark., 2010). Bununla beraber, TLR'lerin adaptif immunitedeki rollerini tamamen anlamak için hala bazı sorulara yanıt bulunması gerekmektedir. TLR'leri aktive eden mikrobiyel komponentlerin tümü DC'ler tarafından IL-12 yapımını indükler ve Th1 hücrelerin gelişmesine yol açar. Doğal immunitenin Th1 (Tip1 T yardımcı hücre) ve Th2 (Tip2 T yardımcı hücre) sitokin gelişimi arasındaki dengeyi nasıl regüle ettiği hala açıklanamamıştır.

Tipik olarak Kanamalı Ateş Virüs replikasyonu, doğal bağışıklığı hızla aktif eder. TLR aracılığı ile dentritik hücreler, interferonlar ve diğer sitokinler, doğal öldürücüler (NK), kompleman proteinler kodlayan genler aktifleşir. Ardından enflamatuar sitokinlerin sentezi ve sekresyonu gerçekleşerek, lökositler enflamasyonun olduğu bölgeye çekilir. İmmün sistemin virüs zarfını harap ederek virüs partiküllerini fagosite ettiği düşünülmektedir (Lauzon ve Ark., 2007).

KKKA Viral patogenezi hakkında çok fazla bilgiye sahip olmamakla birlikte viral kanamalı ateşlerin patogenezi benzerlik göstermektedir (Bray, 2007). Viral kanamalı ateş etkenleri arasında, her bir etkenin patofizyolojisi farklılıklar gösterse de mikrovasküler hasar ve hemoztasın bozulması gibi temel ortak özellikler öne çıkar. KKKA patogenezinde kan ve endotel hücrelerin hedef hücreler olduğu açıktır. Doğrudan endotel hücrelerinde çoğalma veya mononükleer hücrelerden salınan sitokin, kemokin ve diğer mediatörlerin etkisiyle endotel aktivasyonu ve bariyer fonksiyonunda bozulma gerçekleşir. Th1

lenfositler viral infeksiyonlarda TNF- α ve IFN γ üretir. Makrofaj aktivasyonuna ve IL-1/IL-6 sekresyonuna önayak olur. TNF- α viral infeksiyonlarda en önemli rolü erken salgılanan sitokin olmasıdır. TNF- α nötrofillerden süperoksit iyonu, hidrojen peroksit, elastaz ve kollojenaz salınımını ve sentezini uyarır. KKKA hastalarında virüsle enfekte olmuş endotelyum ya da salgılanan sitokin hasarı bazı vazodilatör bileşenlerin üretilmesini uyarır. Örneğin, pıhtı agregasyonu ve koagülebnt proteinlerin aktivasyonu gibi. Koagülasyonun aktivasyonu DIC (yaygın damar içi pıhtılaşma) gelişimine ve organ kaybına neden olur. Ayrıca makrofaj aktivasyonu ve sitokin sekresyonunu takiben KKKA'da içeren birçok kanamalı ateş hastalıklarında hemofagositoz ortaya çıkar. Hastalarda önemli bir bulgu olan hemofagositoz sitopeniye neden olur ve ölüm riskini artırır. Ergönül ve Ark. (2006) TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın KKKA fatal hastalarda oldukça yüksek seviyede olduğunu belirlemişlerdir. KKKA yüksek morbidite ve mortalitesinden sorumlu tutulan sitokin fırtınasının (hipersitokinemi) yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olduğu saptanmıştır. Genel kanıya göre viral kanamalı ateşlerde ölümün kan kaybına bağlı olarak gelişeceği zannedilsede, ölümden septik şok ve çoklu organ yetmezliği sorumludur (Peters ve Zaki, 2006). KKKA hastalarında metabolik profilde meydana gelen değişiklikler TNF- α , IL-1/IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu metabolik değişiklikler sonucu proteinüri ve hematüri oluşur. Hücre enerji metabolizmasının sağlanması ilk aşamada mümkünken daha sonra hastalığın ileri safhalarında sağlanamaz. Bu durumda dokulara oksijen taşınımı bozulur ve hipoksi gelişir. Kim ve Ark. (2010) hücrede (oksidatif stres) hipoksi geliştiğinde üretilen reaktif oksijen türlerin (ROS), monosit THP-1 hücrelerde TLR10 ifadesini ve fonksiyonunu arttıran ikinci mesajcı olarak görev yaptığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda bir Türk Populasyonunda TLR10'a ait üç polimorfik bölgede alel ve genotip belirlenmiş ve KKKA hastalığıyla ilişkisi araştırılmıştır. KKKA hastalığında bu polimorfizm cinsiyete ve yaşa bağlı olarak hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak önemli fark görülmemektedir ($p>0,05$) (Tablo 4). KKKA hasta ve kontrol bireyler arasında alel frekansı dağılımlarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Tablo 5).

Türk popülasyonuna ait yapılan bu çalışma, diğer popülasyonlara ait çalışmalarla karşılaştırıldığında bazı alel sıklıklarında benzerlikler görülürken, bazı alel sıklıklarında farklılıklar görülmüştür. *TLR10* 2322 A/G polimorfizmi için, A aleli Beyaz ırk popülasyonunda %85, Çin popülasyonunda %57, Afrika kökenli Amerikalı popülasyonunda %95,8, Kuzey Amerika popülasyonunda %80 oranında görülmüştür (Tablo10).

Tablo10- Farklı popülasyonlarda tespit edilen *TLR10* Gen polimorfizminin alel ve genotip sıklıklarının dağılımı ve Türk Popülasyonuna ait sonuçlarla karşılaştırılması

TLR10 polimorfizmi	Beyaz ırk (Chen ve Ark 2007)	Çin (Park ve Ark 2010)	Afrika (Altsahra) (Barreiro ve Ark 2009)	Amerika (Afrika kökenli) (Lazarus ve Ark 2004)	Kuzey Amerika (Lazarus ve Ark 2004)	Türk
<i>2322 A/G</i>						
A	85.0	57.0	-	95.8	80.1	71.4
G	15.0	43.0	-	4.2	19.9	28.6
AA	70.0	32.6	-	91.7	64.6	54.7
AG	30.0	48.8	-	8.3	31.0	33.1
GG	-	18.6	-	-	4.0	12.2
<i>720 A/C</i>						
A	72.5	30.0	50.0	54.2	64.6	52.3
C	27.5	70.0	50.0	45.8	35.4	47.7
AA	50.0	4.5	-	33.3	40.7	25.4
AC	45.0	51.1	1	41.7	47.8	53.5
CC	5.0	44.4	-	25.0	11.5	21.1
<i>992 T/A</i>						
T	70.8	47.7	1.0	95.7	50.0	74.9
A	29.2	52.3	-	4.3	50.0	25.1
TT	50.0	25.0	1	91.3	-	55.5
TA	41.7	45.5	-	8.7	1	38.8
AA	8.3	29.5	-	-	-	5.7

TLR10 2322 A/G polimorfizmi tüm genotip dağılımlarında istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Tablo 6). *TLR10* 2322 A/G polimorfizminin farklı etnik kökenlerdeki genotip dağılımına bakıldığında Beyaz

ırk ve Amerika (Afrika kökenli) populasyonlarda varyant tip gözlenmezken, Kuzey Amerika, Beyaz ırk ve Türk populasyonların heterozigot varyant tipin yakın değerlerde olduğu gösterilmiştir (Tablo 10). Çalışmamızda bu polimorfizme ait fatal bireyler arasında AA genotipine sahip birey belirlenemezken, 7 birey AG genotipine ve 6 birey ise GG genotipine sahiptir. *TLR10 2322 A/G* polimorfizmi hasta ve kontrol grubu arasında risk katsayılarını belirlemek üzere hasta ve kontrol grubu arasında tüm genotip karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilememiştir (Tablo 7). Benzer olarak Enevold ve Ark. (2009) MS (çoklu skleroz) hastalığı ile aynı polimorfizm arasında cinsiyete bağlı olarak istatistiksel olarak ilişki bulamamışlardır. Aynı şekilde Park ve Ark. (2010) çocukluk döneminde gözlenen IgA nefropatisi ile bu polimorfizm arasında bir ilişki bulamamıştır.

TLR10 720 A/C polimorfizminde ise A aleli kontrol grubunda %52,3 ve hasta grubunda %64,2'dir. C alel frekansı dağılımı kontrol grubunda %47,4 iken hasta grubunda ise %35,7'dir. KKKA hastalarında *TLR10 720 A/C* polimorfizminde alel A frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ($p=0.010$) (Tablo 5). *TLR10 720 A/C* polimorfizminde farklı etnik kökenlerde oldukça değişken alel frekansı dağılımı gözükmemektedir (Tablo 10). Beyaz ırk populasyonunda A alelinin sıklığı %72,5, Çin populasyonunda %30, Afrika populasyonunda %50, Afrika kökenli Amerikalılarda %54,2, Kuzey Amerika populasyonunda %64,6 oranında belirlenmiştir. Çalıştığımız örneklem grubunda ise A alelinin sıklığı %52,3 oranında ve Afrika ile Afrika kökenli Amerikalı populasyonuna yakın olduğu belirlenmiştir. *TLR10 720 A/C* polimorfizminde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p= 0,023$). Bu polimorfizme ait fatal bireylerin 5'i AA genotipine, 7'si AC genotipine ve 1 birey ise CC genotipine sahiptir. *TLR10 720 A/C* polimorfizminde farklı etnik kökenlerde oldukça değişken genotip frekansı dağılımı göstermektedir. Beyaz ırk populasyonunda varyant tip %5 iken, Çin populasyonunda %44.4 oranında yüksek genotip dağılıma sahiptir. Afrika populasyonunda yalnızca varyant heterozigot genotip gözlenmektedir (Tablo 10). *TLR10 720 A/C* polimorfizminde AA genotipinin AC

genotipiyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemezken ($p>0,05$), CC genotipi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($p= 0,006$). Ayrıca AA genotipinin AC+CC genotip kombinasyonu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p= 0,048$) (Tablo 7). Bu polimorfizm KKKA hastalığı için bir risk faktörü olarak görülmektedir. KKKA gibi negatif polariteli tek zincirli RNA virüsü olan RSV özellikle bebeklerde mortaliteyle sonuçlanan ciddi solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. Mairaparambil ve Ark. (2008) RSV enfekte hastaları 720 A/C polimorfizmiyle ilişkili bulmuşlardır. Zhou ve Ark. (2006) bir DNA virüsü EBV'nin neden olduğu nazofaringal karsinoma ile 720C genotipini ilişkilendirmişlerdir. Buna göre mutant alelin, EBV'nin tanımlanmasında ve inflamasyonun düzenlenmesinde bireysel riski arttırabileceği yönündedir. Ayrıca Stevens ve Ark. (2008) prostat kanserli hastalarda aynı polimorfizme ait homozigot varyant genotipin prostat kanser riskini azalttığını belirlemişlerdir.

Erkek hasta ve kontrol popülasyonları arasında *TLR10* 720 A/C polimorfizmi açısından AA genotipinin CC genotipiyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p=0,004$) (Tablo 8). Bu polimorfizmin AA genotipinin AC ve AC+CC genotipleri karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak önemli ilişki bulunamamıştır (Tablo 8). Kadınlarda *TLR10* 720 A/C polimorfizmi açısından hasta ve kontrol bireyler arasındaki tüm genotip karşılaştırmalarında istatistiksel olarak önemli ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 9).

TLR10 992 T/A polimorfizmi için A aleli frekansı kontrol grubunda %25,1 ve hasta grubunda %27,2'dir. T aleli frekans dağılımı kontrol grubunda %74,8, hasta grubunda ise %72,7'dir. KKKA hasta ve kontrol bireyler arasında alel dağılımında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Tablo 5). *TLR10* 992 T/A polimorfizminde T alelinin frekansı Beyaz ırk popülasyonunda %70,8, Çin popülasyonunda %47,7, Afrika popülasyonunda %100, Afrika kökenli Amerikalı popülasyonunda %95,7, Kuzey Amerikalılarda %50 oranında görülmüştür. 992 T/A polimorfizminde Afrika popülasyonunun polimorfik olmadığı gösterilmiştir (Tablo 10). Türk popülasyonunda 992 T/A

polimorfizminde *T* alelinin frekansı %74,9 oranındadır ve daha çok Beyaz ırk popülasyonuna yakın olduğu görülmüştür (Tablo 10). *TLR10 992 T/A* polimorfizminde hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları açısından istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). *TLR10 992 T/A* polimorfizminde kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesinde iken ($p= 0,720$), hasta grubu Hardy-Weinberg dengesinde değildir ($p= 0,022$) (Tablo 6). Bunun nedeninin örnek sayısının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *992 T/A* polimorfizminde farklı popülasyonların genotip sıklıkları ile yapılan karşılaştırmalarda Beyaz ırk ve Türk popülasyonları *T* alelinin oluşturduğu genotipler arasında çok büyük fark olmadığı görülmektedir. Afrika kökenli Amerikalılarda ise *TT* genotip sıklığı oldukça yüksek olduğu belirlenmiş ve *A* aleline ait genotipe rastlanmamıştır (Tablo 10). *TLR10 992 T/A* polimorfizminde *TT* genotipinin *AA* genotipiyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememesine rağmen *AA* genotipine sahip bireyler 1,93 kat daha yüksek risk grubunda olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda *992 T/A* polimorfizmi için fatal bireylerden *TT* genotipine sahip 7 birey, *TA* genotipine sahip 3 birey ve *AA* genotipine sahip 3 birey belirlenmiştir.

Kruif ve Ark. (2008) KKKK enfeksiyonuna benzer viral hemorajik ateşe neden olan Dengue virüs enfeksiyonunun primer ve sekonder aşamalarında farklı TLR lerin ve farklı immün cevapların aktif olduğunu belirlemişlerdir. Hastalık şiddeti ateş, kanama, şok sendromu gibi aşamalarıyla oluşan interferon yolağıyla ilişkili sitokinlerin yukarı sinyal için düzenleme ve nükleer faktör kappa B yolağıyla ilişkili sitokinlerin aşağı sinyal için düzenleme şeklinde immün cevabın farklılaşmasını ilişkili bulmuşlardır. Ayrıca *TLR10* geni mRNA istatistiksel analizinde hastalığın şiddetli dönemlerinde ilişki bulunmadığı halde hastalığın iyileşme döneminde TLR1 ve TLR10 ifadesinin önemli olma eğilimi gösterdiğini belirlemişlerdir. Benzer olarak KKK Ateşinde de hastalarda farklı klinik sonuçların olması TLR leri de içeren doğal immün sistemin varyasyonlarıyla ilişkili olabilir. Genlerin regülatör (düzenleyici) bölgelerinde bulunan polimorfik aleller genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik değişikliklere neden olabilir. TLR genlerindeki polimorfizm inflamatuvar ya da

antienflamatuar sitokin üretimini ve konsantrasyonunu etkileyebilir. Genetik polimorfizmlerin enfeksiyona yatkınlık ve hastalarda mortalite artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Ergönül ve Ark., 2009).

TLR10 dışında diğer TLR üyelerinin spesifik ligandları tanımlanmış olmasına rağmen başka ligandlarla da ilişkili olabileceği belirlenmiştir. 2001 yılında keşfedilmiş olan TLR3'ün bazı virüslerin genetik materyali olan çift zincirli RNA'ları tanıdığı belirlendi. Daha sonra, Barton ve Ark. (2007) TLR3'ün bir DNA virüsünün neden olduğu MCMV (fare sitomegalo virüs) enfeksiyonuna karşı da savunmada önemli rol oynadığını bulmuşlardır. Bu veri TLR'in günümüz literatüründe kayıtlı olmayan bazı viral proteinleri de tanıdığını gösteriyor.

Lökositler arasında TLR10 ifadesi B lenfositlerde oldukça yüksektir ve CpG DNA gibi B hücre aktivatörlerin etkisiyle sayıları artar. Çocukluk dönemlerinde yoğun olarak CpG DNA'ya maruz kalma ileriki yaşlarda atopik (Alerjik reaksiyonları geliştirmeye yönelik bir kalıtsal yatkınlık) hastalık yaygınlığını büyük ölçüde arttırmaktadır. Buna ilişkin, Lazarus ve Ark.(2004) Afrika kökenli Amerikalı ve Avrupa kökenli Amerikalı iki farklı popülasyonda TLR10 polimorfizmini astımla ilişkili bulmuşlardır.

KKKAV mononükleer fagositleri, hepatitler ve endotel hücreleri enfekte eder (Burt ve Ark., 1997). IFN- α , KKKAV Virüs replikasyonunu engellediği belirlenmiştir (Andersson ve Ark., 2006). Enfekte A549 hücre hatlarında IRF-3 aktivasyon yolunda KKKAV müdahalesi yüzünden doğal cevap aktivasyonu ertelenir (Andersson ve Ark., 2008). Makrofaj ve dendritik hücreler immün cevap için doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık arasında güçlü bir bağlantı kurar. Lassa ve Ebola virüsleri gibi kanamalı ateşlerin patogeneğinde önemli rol oynar (Bray, 2007).

Enfekte periferik kan mononükleer hücreleri KKKAV'nin dendritik hücrelere geçişine izin verir. Burada sitokinlerin açığa çıkmasıyla bir cevap oluşur (Connolly- Andersen, 2009). Peyferitte ve Ark. (2010) KKKAV hem dendritik hücrelerde hemde makrofajda replike olduğunu belirlemişlerdir.

İmmün cevabın başlaması için dendritik hücrelerin olgunlaşması gereklidir. Enfeksiyon sonrası dendritik hücreler, kemokin reseptörler ve ko-

stimulatörlerin çeşitli yukarı sinyal yolağı ve proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin sekresyonu yoluyla cevapları başlar. KKKAV dendritik hücreleri olgunlaşması için indüklediğı belirlenmiştir. Hem dendritik hücreler hemde makrofajlar KKKAV infeksiyonuna izin verir. KKKAV infeksiyonunda patojenik şelalelerde bazı önemli mediatörlerin proinflamatuvar sitokinler, interlökin IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α gibi serbestlenmesi için fonksiyoneldir. KKKAV enfekte dendritik hücrelerde önemli oranda IL-6, IL-8 sekresyonu belirlenmiştir. KKKAV enfekte dendritik hücrelerde ve makrofajlarda IFN- α ifadesini aktif eder.

Virüs antiviral genlerin transkripsiyonunu aktif eder. Sentez seviyesi dendritik hücrelerde makrofajlara göre oldukça yüksektir (Bray, 2007). Dendritik hücreler ve makrofajlar KKKAV üretimi için bu hücrenin iki tipi infeksiyonun erken dönemlerinde virüsün patogenezinde anahtar rol oynar. İlk virüsün tanımlanması ile uyarılan makrofajlar tümör nekrosiz faktör (TNF- α), IL-1, IL-6 ve trombosit aktif eden faktör sitokin şelalelerini başlatır. Lökositlerde ve endotel hücrelerdeki adezyon eğilimi artar. Bu olayların sonunda aktif olmuş nötrofiller endotele yapışarak dokulara göç eder. Bu inflamatuvar yanıt doku hasarını, hemodinamik bozuklukları ve organ disfonksiyonuna neden olur. TLR10 ifadesi nötrofillerde oldukça yüksek seviyede belirlenmiştir (Komiya ve Ark., 2006).

Sonuç olarak bu çalışmayla 2322 A/G, 720 A/C ve 992 T/A polimorfizimleri bir Türk populasyonunda alel ve genotip sıklıkları ilk defa belirlenmiştir. 2322 A/G ve 992 T/A polimorfizimlerinde hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı tespit edilmiştir. 720 A/C polimorfizminde ise hasta ve kontrol arasında heterozigot ve homozigot mutant bireylerin karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ancak, günümüzde TLR10 proteinin ligandı ve işlevi bilinmemesinden dolayı, KKKA hastalığı arasında etkileşim mekanizmasının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

5- KAYNAKLAR

- Akira S.** 2003. Toll-like Receptor Signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*. 278,40, 38105–38108.
- Akira S., Yamamoto M., Takeda K.** 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochemical Society Transactions*. 637-42.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Altamura L.A., Bertolotti-Ciarlet A., Teigler J., Paragas J., Schmaljohn C.S., Doms R.W.** 2007. Identification of a Novel C-Terminal Cleavage of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus PreG_N That Leads to Generation of an NS_M Protein. *Journal of Virology*. 6632-6642.
- Arslan S., Engin A.** (yayınlanmamış veri). NF-κB1 and NF-κBIA Genetic Polymorphisms in Crimean Congo Haemorrhagic Fever.
- Andersson L., Lundkvist A., Haller O., Mirazimi A.** 2006. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J. Med. Virol.* 2, 216-22.
- Andersson L., Karlberg H., Mousavi-Jazi M., Martinez-Sobrido L., Weber F., Mirazimi A.** 2008. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delay activation of the innate immune response. *J. Med. Virol.* 80, 1397-1404.
- Barreiro L.B., Ben-Ali M., Quach H., Laval G., Patin E.** 2009. Evolutionary Dynamics of Human Toll-Like Receptors and Their Different Contributions to Host Defense. *PLoS Genet.* 5(7), e1000562.
- Barton G.M.** 2007. Viral recognition by Toll Benzeri receptors. *Semin immunol.* 19(1), 33-40.

- Bergeron E., Albariño C. G., Khristova M. G., Nichol S. T.** 2010. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *J. Virol.* 84(1), 216–226.
- Bishop D.H.**, 1996. Biology and molecular biology of bunyaviruses. In: Elliott, R.M. (Ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York. 19–61.
- Bonnert T.P., Garka K.E., Parnet P., Sonoda G., Testa J.R., Sims J.E.** 1997. The cloning and characterization of human MyD88: A member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett.* 402, 81–84
- Bourke E., Bosisio D., Golay J., Polentarutti N., Mantovani A.** 2003. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*, 102(3), 956-63.
- Bray M.** 2007. Comparative Pathogenesis of Crimean Congo Hemorrhagic Fever and Ebola Hemorrhagic Fever. *Biomedical and Life Sciences*. 4, 221-231.
- Burt F.J., Spencer D.C., Leman P.A., Patterson B., Swanepoel R.** 1996. Investigation of tick-borne viruses as pathogens of humans in South Africa and evidence of Dugbe virus infection in a patient with prolonged thrombocytopenia. *Epidemiol. Infect.* 116, 353–361.
- Cao Z., Henzel W.J., Gao X.** 1996a. IRAK: A kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*. 271, 1128–1131.
- Chen Y.C., Giovannucci E., Kraft P., Lazarus R., Hunter D.J.** 2007. Association between Toll-like receptor gene cluster (TLR6, TLR1, and TLR10) and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10, 1982-9.

Chuang T.H., Ulevitch R.J. 2001. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1518, 157-161

Chumakov M.P. 1974. On 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever. *Tr. Inst. Polio Virusn. Entsefalitov Akad. Med. Nauk SSSR* 22, 5–18 (in Russian; in English, NAMRU3-T950).

Chumakov M.P., Smirnova S.E., Shalunova N.Y., Mart'yanova L.I., Fleer G.P., Zgurskaya G.N., Maksumov S.S., Kasymov K.Y., Pak T.P. 1976. Proofs of etiological identity to Crimean hemorrhagic fever in Central Asian hemorrhagic fever. In: IX International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Athens. 1, 33–34.

Connolly-Andersen A. M., Magnusson K. E., Mirazimi A. 2007. Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Polarized MDCK-1 Cells. *Journal of Virology*. 81, 2158-2164.

Couillault C., Pujol N., Reboul J., Sabatier L., Guichou J.F., Kohara Y., Ewbank J.J. 2004. TLR independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR motif adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol.* 5, 488–494

Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., Baltimore D. 2005. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*. 309, 1854–1857.

- Croston G.E., Cao Z., Goeddel D.V.**1995.NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. J Biol Chem. 270, 16514–16517.
- Donets M.A., Chumakov M.P., Korolev M.B., Rubin S.G.**1977. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever. Intervirology. 8, 294–308.
- Dunne A., Ejdeba M., Ludidi P.L., O'Neill L.J., Gay N.J.**2003. Structural Complementarity of Toll/Interleukin-1 Receptor Motifs in Toll-like Receptors and the Adaptors Mal and MyD88*. The Journal Of Biological Chemistry. 278 (42), 41443–41451.
- Ellis D.S., Southee T., Lloyd, G., Platt G.S., Jones, N., Stamford S., Bowen E.T., Simpson D.I.**1981. Congo/Crimean haemorrhagic fever virus from Iraq, 1979. I. Morphology in BHK 21 cells. Arch. Virol. 70, 189–198.
- Enevold C., Otura A.B., Sgrensen P.S., Ryder L.P., Koch-Henriksen N., Bendtzen K.** 2009. Multiple sclerosis and polymorphisms of innate pattern recognition receptors TLR1-10, NOD1-2, DDX58, and IFIH1. J.Neuroimmunol.212(1-2),125-31.
- Engin A., Arslan S., Kizildag S., Ozturk H., Elaldi N., Dokmetas I., Bakir M.**2010.Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Microbes and Infection.1071-1078.
- Ergönül Ö.**2009. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. ANKEM Dergisi. 23(Ek 2):234-240.

Finberg R.W., Wang J.P., Kurt-Jones E.A.2007.Toll Benzeri receptors and viruses. Reviews Medical Virology. 1,35-43.

Fitzgerald K.A., Palsson-McDermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A.2001.Mal (MyD88–adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction.Nature. 413, 78–83.

Fitzgerald K.A., McWhirter S.M., Faia K.L., Rowe D.C., Latz E., Golenbock D.T., Coyle A.J., Liao S.M., Maniatis T.2003a.IK κ apkasilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. Nat Immunol. 4, 491–496.

Flick R., Flick K., Feldmann H., Elgh F. 2003. Reverse Genetics for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Virus Journal of Virology.77, 5997-6006.

Gay N., Gangloff M., Weber A.2006.Toll-like receptors as molecular switches. Nature Rev Immunol. 6, 693–698.

Hoogstraal H.1979.The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. J. Med. Entomol. 15,307–417.

Hultmark D.1994.Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. Biochem Biophys Res Commun. 199, 144–146.

Kamon H., Kawabe T., Kitamura H., Lee J., Kamimura D., Kaisho T., Akira S., Iwamatsu A., Koga H., Murakami M., Hirano T.2006.TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. Embo J. 25, 4108–4119.

- Karin M., Ben-Neriah Y.**2000.Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.*18, 621–663.
- Kawai T., Akira S.**2004.Toll-like receptor downstream signaling.*Arthritis Research and Therapy.*7(1), 12–9.
- Kawai T., Sato S., Ishii K.J., Coban C., Hemmi H., Yamamoto M., Terai K., Matsuda M., Inoue J., Uematsu S., Takeuchi O., Akira S.**2004.Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol.*5, 1061–1068.
- Kawai T., Akira S.**2006. TLR signaling *Cell Death and Differentiation.*13, 816–825.
- Kawai, T., Akira, S.**2009.The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21, 317-337.
- Kim D. , Kim Y.J. , Koh H.S., Jang T.Y., Park H. E., Kim J.Y.**2010. Reactive Oxygen Species Enhance TLR10 Expression in the Human Monocytic Cell Line THP-1. *International Journal of Molecular Sciences.*11, 3769-3782.
- Khor C.C., Chapman S.J., Vannberg F.O., Dunne A., Murphy C., Ling E.Y., Frodsham A.J., Walley A.J., Kyrieleis O., Khan A., Aucan C., Segal S., Moore C.E., Knox K., Campbell S.J., Lienhardt C., Scott A., Aaby P., Sow O.Y., Grignani R.T., Sillah J., Sirugo G., Peshu N., Williams T.N., Maitland K., Davies R.J., Kwiatkowski D.P., Day N.P., Yala D., Crook D.W., Marsh K., Berkley J.A., O'Neill L.A., Hill A.V.**2007.A Mal functional variant is associated with protection against invasive

pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature Genetics*.39(4),523-8.

Komiya A., Nagase H., Okugawa S., Ota Y., Suzukawa M., Kawakami A., Sekiya T., Matsushima K., Ohta K., Hirai K., Yamamoto K., Yamaguchi M.2006. Expression and Function of Toll-Like Receptors in Human Basophils. *Int Arch Allergy Immunol*.140,23–27.

Kruif M.D., Setiati T.E., Mairuhu A.T., Koraka P., Aberson H.A., Spek C.A., Osterhaus A.D., Reitsma P.H., Brandjes D., Soemantri A., Gorp E.C.2008.Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections.*Plos*.2-4.

Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., Golenbock D.T.2004.TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5,190–198.

Lauzon N., Mian F., Ashkar A.2007. Toll-like Receptors, Natural Killer Cells and Innate Immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.598,1-11.

Lazarus R., Raby B.A., Lange C., Silverman E.K., Kwiatkowski D.J., Vercelli D., Klimecki W.J., Martinez F. D., Weiss S.T.2004.Toll-like Receptor 10 Genetic Variation Is Associated with Asthma in Two Independent Samples. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 170, 594-600.

Lord K.A., Abdollahi A., Hoffman-Liebermann B., Liebermann D.A.1990a. Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to

terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ.* 1,637–645.

Ma X., Liu. Y., Gowen B.B., Graviss E.A., Clark A.G., Musser J.M. 2007. Full-Exon Resequencing Reveals Toll-Like Receptor Variants Contribute to Human Susceptibility to Tuberculosis Disease. *Plos One.*2(12), e1318.

Mailaparambil B., Krueger M., Heinze J., Forster J., Heinzmann A.2008. Polymorphisms of Toll Benzeri receptors in the genetics of severe RSV associated diseases. 25(1),59-65.

Mansell A, Brint E, Gould JA, O'Neill LA, Hertzog PJ.2004.Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 279, 37227–37230.

Medzhitov R., Janeway C.A.2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science.* 296 (5566), 298-300.

Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J.2004.RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.* 5, 503–507.

Midilli K., Gargili A., Ergonul O., Sengoz G., Ozturk R., Bakar M., Jongejan F.2007.Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul.*BMC, Infect. Dis.*54.

Mink M, Fogelgren B, Olszewski K, Maroy P, Csiszar K.2001. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* 74, 234–244.

- Morikawa S., Saijo M., Kurane I.**2007. Recent progress in molecular biology of Crimean- Congo hemorrhagic fever. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 30, 375-389.
- Murphy F.A., Harrison, A.K., Tzianabos, T.**1968. Electron microscopic observations of mouse brain infected with Bunyamwera group arboviruses. *J. Virol.* 2, 1315–1325.
- Murphy, F.A., Harrison, A.K., Whitfield, S.G.**1973.*Bunyaviridae*: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serological supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology*. 1,297–316.
- Muzio M., Ni J., Feng P., Dixit V.M.**1997.IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 278, 1612–1615.
- Nyman T., Stenmark P., Flodin S., Johansson I., Hammarström M., Nordlund P.**2008.The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic motif reveals a putative signaling dimer. *Journal Biological Chemistry*. 283(18),11861-5.
- Okumura A., Pitha P.A., Yoshimura A., Harty R. A.**2009. Interaction Between Ebola Virus Glycoprotein and Host TLR-4 Leads to Induction of Pro-Inflammatory Cytokines and SOCS1. *J. Virol.*10,1128.
- Park H.J., Hahn W.H., Suh J.S., Kim M.J., Kang S.K., Lee J.S., Kim J.W., Chung J.H., Cho B.S.**2011. Association between toll-like receptor 10 (TLR10) gene polymorphisms and childhood IgA nephropathy. *European Journal of Pediatrics*. 170(4),503-9.

- Peters CJ, Zaki SR.**2006. Overview of viral hemorrhagic fevers. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice*. 726-33.
- Peyferitte C.N., Perret M., Garcia S., Rodrigues R., Bagnaud A., Lacote S., Crance J.M., Vernet G., Garin D., Bouley M., Baccala G.P.**2010.Differential activation profiles of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and Dugbe virus infected antigen presenting cells.*Journal of General Virology*.189-198.
- Purdue M.P., Lan Q.,Wang S.S.,Kricker A., Menashe I., Zheng T.Z., Hartge P., Grulich A.E., Zhang Y., Morton L.M., Vajdic C.M., Holford T.R., Severson R.K., Leaderer B.P., Cerhan J.R., Yeager M.,Cozen W, Jacobs K.,Davis S.,Rothman N., Chanock S.J., Chatterjee N., Armstrong B.K.** 2009.A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 30(2), 275–281.
- Ranjith-Kumar C.T., Miller W., Xiong J., Russell W.K., Lamb R., Santos J., Duffy K.E., Cleveland L., Park M., Bhardwaj K., Wu Z., Russell D.H., Sarisky R.T., Mbow M.L., Kao C.C.**2007.Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectomotif. *J Biol Chem*. 23427–23432.
- Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S.**2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*. 34, 2541–2550.
- Sambrook, J., Russell D.W.**1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.),Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sanchez A. J., Vincent M. J., Nichol S. T.**2002. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal of Virology*. 7263–7275.
- Sanchez A. J., Vincent M. J., Erickson B.R., Nichol S.T.**2006. Creamen-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Precursor Is Cleaved by Furin-Like and SKI-1 Proteases To Generate a Novel 38-Kilodalton Glycoprotein. *Journal of Virology*.514-525.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S.**2003.Toll/IL-1 receptor motif-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptorassociated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling.J. Immunol.171, 4304–4310.
- Schreibelt G., Tel J., Sliepen K.H., Benitez-Ribas D., Figdor C.G., Adema G.J., de Vries IJ.**2010.Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*.59(10),1573-82.
- Serter D.**1980 Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. In: Vesenjakhirjan J, Calisher C, editors. *Arboviruses in the Mediterranean countries*. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer Verlag. 155-61.
- Sun D., Ding A.**2006.MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat. Immunol.* 7, 375–381.
- Stevens V.L., Hsing A.W., Talbot JT, Zheng SL, Sun J, Chen J, Thun MJ, Xu J, Calle EE, Rodriguez C.**2008.Genetic variation in the toll-like receptor

gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) and prostate cancer risk. *International journal of cancer*.123(11),2644-50.

Takaoka A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano S., Honda K., Ohba Y., Mak T.W., Taniguchi T.2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*.10,243-9.

Takeda K., Akira S.2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 16,3–9.

Tanaka N.2001. Infection of herpes simplex virus (HSV) and Epstein-Barr virus (EBV) in acute tonsillitis: histopathological assessment by optical and electron microscopic observation of biopsy specimens of tonsils. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 104,1093.

Uzma A. H., Sandra D, Jaromir V.2004.Differential induction of gene promoter constructs by constitutively active human TLRs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321, 124-131.

Uzma H., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Brière F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E.2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *The Journal of Immunology*.174, 2942-2950.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S.1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 9, 2723–2735.

- Yamagata M., Merlie J.P., Sanes J.R.**1994.Interspecific comparisons reveal conserved features of the *Drosophila* Toll protein. *Gene*. 139,223–228.
- Yamamoto Y., Kim D.W., Kwak Y.T., Prajapati S., Verma U., Gaynor R.B.**2001.IKKgamma/NEMO facilitates the recruitment of the IkappaB proteins into the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem*. 276, 36327–36336.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S.**2003a.Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301, 640–643.
- Zhou X.X., Jia W.H., Shen G.P., Qin H.D., Yu X.J., Chen L.Z., Feng Q.S., Shugart Y.Y., Zeng Y.X.**2006. Sequence variants in toll-like receptor 10 are associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*.5,862-6.

6- ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Sivas'ta doğdu. 2008 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm'ünden mezun oldu. Aynı yıl Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

7- EKLER

Ek 1. Kimyasallar

No	Kimyasal	Kod
1	<i>VspI</i>	Fermentas ER0911
2	<i>Hin1II</i>	Fermentas ER1831
3	<i>XbaI</i>	Fermentas ER0681
4	dNTP set	Fermentas R0181
5	Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Merk 324503
6	Tris	Sigma 93362
7	Borik Asit	Merk 203667
8	Glasiyel Asetik Asit	Merk ACS003
9	İzoamilalkol	Merk 818969
10	Formaldehit	Merk 344198
11	Kloroform	Merk 822265
12	Etanol	Merk 107017
13	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Amresco 0227
14	Agaroz	Bioron 604001
15	Bromfenol Mavisi	Amresco 0449
16	Etidyum Bromür	Amresco 0492
17	<i>Taq</i> DNA Polimeraz	Fermentas EPO402
18	Mineral Yağ	Applichem A2135

Ek 2. dNTP - Tamponlar ve stok çözeltiler

1. dNTP (10X)

Her 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'den 10 µl alınarak, 460 µl steril distile su eklendi ve karıştırıldı. Böylece her biri için 2 mM konsantrasyon elde edildi.

2. EDTA (0,5 M, pH:8)

EDTA (186,12 g) 800 ml distile suda çözündürüldü ve pH, 10 N NaOH ile 8,0'e ayarlandı. Çözelti 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 50x TAE

Tris (242 g) distile suda çözündürüldü . Sonra, 57,1 ml glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH:8) eklendi. Hacim 1000 ml distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

4. TE (40X)

Tris-Cl (100mM pH:8)

EDTA (10mM pH:8)

Çözelti 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

5. SDS (% 10)

SDS (10 g) 80ml distile 68 °C'de ısıtılarak çözündürüldü , HCl pH:7,2'ye ayarlandı. Ve son hacim distile suyla 100ml 'ye tamamlandı.

6. Fenol

İlk olarak +4 °C'den çıkarılıp oda sıcaklığına kadar ısıtıldı ve 68 °C'de eritildi. Son konsantrasyon %0,2 olacak şekilde hidroksikinolin eklendi. Daha sonra eşit hacimde 0,5 M Tris HCl (pH:8,0) eklenerek, karışım 15 dakika

karıştırıldı, iki faz oluşması beklendi. Üst ayırma hunisiyle uzaklaştırıldı ve fenol üzerine eşit hacimde 0,1 M Tris HCl (pH:8,0) eklendi. Karışım tekrar 15 dakika karıştırıldıktan sonra üst faz uzaklaştırıldı. Özütlemeye fenolik fazın pH'ı 7,8'den büyük oluncaya kadar devam edildi. PH, pH kağıdı kullanılarak ölçüldü. PH dengelendikten ve son kez üst faz uzaklaştırıldıktan sonra , 0,1 M Tris HCl 'den (pH:8) 0,1 hacim eklendi. Karışım parçalara ayrılarak -20 'C'de saklandı. Fenol, kullanmadan önce oda sıcaklığına kadar eritildi, %0,1β-merkaptoetanol eklendi.

7. Kloroform İzoamil Alkol (24:1)

Kloroform (96 ml) 4 ml izoamil alkolle karıştırıldı.

8. TBE (10X)

Tris (54 g), 22,5 g borik asit ve 4,1 g EDTA bir miktar distile suda çözüldürüldükten sonra 500 ml'ye tamamlandı.

9. TES Tamponu

Beş ml 1 M Tris, 1 ml 5 M NaCl, 1 ml 0,5 M EDTA distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

10. Etidyum Bromür Stok Çözeltisi (10 mg/ml)

Etidyum bromür (0,5 g) 50 ml distile suda çözüldürüldü.

11. DNA Moleküler Ağırlık Markörü Dilüsyonu

Altı µl markör, 6 µl yükleme tamponu ve 49 µl distile su karıştırılarak 100 ng/µl konsantrasyon elde edildi.

ETİK KURULU KARARI



Sayı : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/ 53

26.01.2010

Konu:

Karar No: 2009-12/09

Yrd.Doç.Dr.Serdar ARSLAN'ın, "Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığı İle Toll Like Reseptör 10 (TLR 10) Genetik Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması" isimli projeye ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda adı geçen araştırmanın gerçekleştirilmesinde sakınca olmadığına;

Karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı Soyadı	Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Dalı	İmzası
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Başkan	Farmakoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ali KAYA	Üye	Çocuk Sağ.ve Hast.	
Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM	Üye	Deontoloji	katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Sefa GÜLTÜRK	Üye	Fizyoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ziynet ÇINAR	Üye	Biyoistatistik	
Doç.Dr.Nazım ÖZTÜRK	Üye	Sağl.Mcs.Mens.olmayan	
Uzm.Dr.Fikret ÖZKAN	Üye	Anesteziyoloji	
Uzm.Dr.Emin Ertan TEMİZÖZ	Üye	Oroloji	
Uzm.Dr.Yaşar ALPARSLAN	Üye	Nöroloji	
Uzm.Dr.Panek IRMAK	Üye	Biyokimya	
Ecz.Selma ÖZGÜNEŞ	Üye	Eczacılık	
Av.Gülşay BUYRUK	Üye	Hukuk	