

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**ASTIMLI ÇOCUKLARDA
CD14 C159T POLİMORFİZMİNİN
İN VİTRO IG E SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Uzm. Dr. Özge UYSAL SOYER

**YANDAL TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**ANKARA
2008**

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**ASTIMLI ÇOCUKLARDA
CD14 C159T POLİMORFİZMİNİN
İN VİTRO İG E SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Uzm. Dr. Özge UYSAL SOYER

YANDAL TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Cansın SAÇKESEN

ANKARA

2008

ÖZET

U. SOYER, Özge, Astımlı Çocuklarda CD14 C159T Polimorfizminin *in vitro* IgE Sentezi Üzerine Etkileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Çocuk Allerji ve Astım Yandal Tezi. Ankara, 2008. CD14 promotor C159T polimorfizmleri ve total IgE seviyeleri arasında iyi tanımlanmış bir ilişki bulunmasına rağmen bu ilişkinin hücresel ve moleküler temelleri bilinmemektedir. Daha önce TT genotipine sahip astımlı Türk çocuklarında plazmada daha düşük total IgE düzeylerini göstermiştik. Bu çalışmanın amacı CD14 C159T polimorfizminin farklı genotiplerine sahip astımlı çocukların periferik kan mononükleer hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda endotoksine IgE yanıtını incelemektir. CD 14 CC ve TT genotipli çocukların periferik kanlarından mononükleer hücreler izole edildi. Hücreler 12 gün süresince endotoksin olmadan ve 2 ve 200 ng/ml dozlarında endotoksin ile kültüre kondu. Onikinci gün hücre kültürü süpernatantlarından ELISA yöntemi ile IgE düzeyleri ölçüldü. Her iki genotip arasında IgE yanıtları karşılaştırıldı. CC genotipinde 22, TT genotipinde 23 hasta vardı. TT genotipli çocuklarda, lipolisakkarid 200 ng/ml ile uyarı hücre kültürü süpernatantlarında IgE’de artış ile [0.73 (0.1-1.75) ng/mL ve 2.61 (0.7-5.21) ng/mL, $p=0.001$] sonuçlanırken CC genotipinde değişiklik saptanmadı [0.85 (0.46-2.06) ng/mL ve 0.83 (0.18-1.64) ng/mL]. Endotoksin CD14 C159T TT genotipine sahip astımlı çocuklarda IgE sentezini transkripsiyonel düzeyde etkileyerek artırmaktaydı. TT genotipinde hücrelerin uyarılmamış koşula göre LPS 2 ng/ml ile uyarılması sonucu transkripsiyonel düzeyde 2.31 (0.99-37) kat artış ($p=0.003$), LPS 200 ng/ml ile uyarılması sonucu 1.99 (0.95-107.4) kat artış saptandı ($p=0.008$). CD14 C159T polimorfizmi CC ve TT genotipine sahip astımlı çocukların *in vitro* koşullarda düşük ve yüksek LPS dozuna farklı düzeylerde IgE sentezi ile yanıt verdiğini göstermiştir. Bu bulgular “ endotoksin switch” olarak önerilen bimodel hipotezle uyumludur.

Anahtar kelimeler: Astım, çocuk, CD14 C159T polimorfizmi, IgE, hücre kültürü

ABSTRACT

U. SOYER, Özge, The in vitro effects of CD14 C159T polymorphism on IgE synthesis in children with asthma. Hacettepe University, Faculty of Medicine. Thesis in Pediatric Allergy and Asthma. Ankara, 2008. Even though there is a well established association between the CD14 promoter C159T polymorphisms and total IgE level, the cellular and molecular basis of this association is not known. We have previously shown that Turkish children with asthma possessing the TT genotype have lower levels of total IgE in plasma. The aim is to determine whether peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children with alternative genotypes at the CD14 C159T locus produce different amounts of IgE upon stimulation with various concentrations of endotoxin. PBMC were isolated from the peripheral blood of asthmatic children with CC and TT genotypes at CD14 C159T locus. Cells were cultured in complete medium for 12 days and IgE was measured in the supernatants using a home made sandwich ELISA. The cells were cultured in the presence and absence of 2 and 200 ng/ml concentration of endotoxin. IgE response in the cell supernatants were compared between the two genotypes. There were 22 and 23 with CC and TT genotypes, respectively. In children with the TT genotype, stimulation with LPS at 200 ng/ml resulted in a significant elevation from 0.73 (0.1-1.75) ng/mL to 2.61 (0.7-5.21) ng/mL, $p=0.001$ whereas no increase was observed in the CC genotype [0.85 (0.46-2.06) ng/mL to 0.83 (0.18-1.64) ng/mL]. Endotoxin increased IgE synthesis by acting on transcriptional level in asthmatic children with CD14 C159T TT genotype. In TT genotype, epsilon germline transcription increased 2.31 (0.99-37) fold ($p=0.003$) by LPS 2 ng/ml stimulation and 1.99 (0.95-107.4) fold ($p=0.008$) by LPS 200 ng/ml stimulation compared to unstimulated condition. Asthmatic children with CD14 C159T polymorphism CC and TT genotypes responded with different concentrations of IgE in response to low and high doses of LPS. These findings are compatible with “endotoxin switch” , bimodel hypothesis.

Keywords: Asthma, child, CD14 C159T polymorphism, IgE, cell culture

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hijyen hipotezi	3
2.2. Astım ve Atopi	5
2.3. Immunoglobulin E ve regülasyonu	5
2.3.1. CD40 sinyali	6
2.3.2. IgE Sentezinde IL-4, IL-13 Sitokin ve Reseptörlerinin Rolü	7
2.4. Hijyen Hipotezi – endotoksin	8
2.5. Endotoksin: Hücresel etkileri ve astımdaki rolü	9
2.5.1. Endotoksin ve endotoksin reseptörü olan CD14'ün yapısı ve özellikleri	11
2.5.2. Endotoksinin hücresel düzeyde etkileri	11
2.5.3. Endotoksin: Allerjik hastalıklar ile ilişkisi ve IgE sentezi üzerine etkileri	15
2.6. CD14 genetik değişkenlikleri ve IgE sentezi üzerine olan etkileri	15
2.6.1. CD14 -159 TT genotipinin düşük serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar	16
2.6.2. CD14 -159 TT genotipinin yüksek serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar	17
2.6.3. CD14 -159 TT genotipinin serum IgE düzeyleri ile ilişkili olmadığını gösteren çalışmalar	18
2.6.4. Gen-çevre etkileşimi ve allerjik hastalıklar	19
2.6.5. Gen çevre etkileşimi bağlamında CD14 C159T polimorfizmi	19
2.6.6. Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizminin astım fenotipleri üzerine etkisi	21
2.6.7. Astımlı çocuklarda CD14 C159T polimorfizminin endotoksin ile uyarılan periferik kan mononükleer hücrelerinin sitokin yanıtı üzerine etkisi	22

GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Hastaların belirlenmesi	27
3.1.1 Hastaların genotiplerinin saptanması	27
3.1.2. Çalışma grubu	28
3.2. Hücre kültürlerinin yapılması	29
3.2.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu	29
3.2.2. IMDM Besiyerinin Hazırlanması ve Hücre Kültürü	29
3.2.3. Hücre Kültür Koşulları	30
3.3. Hücre kültürü süpernatantlarında IgE ölçümü	30
3.4. RNA izolasyonu	34
3.5. Komplementer DNA (cDNA) eldesi	34
3.6. <i>Real Time</i> Polimeraz zincir reaksiyonu	35
3.7. İstatistiksel Analiz	36
BULGULAR	37
4.1 Genel özellikler	37
4.2.1 IL-2, IL-4 ve CD40L ile stimülasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri	38
4.2.2 LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile stimülasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri	40
4.3 LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültüründe “epsilon <i>germ line</i> ” transkripsiyonu	43
TARTIŞMA	44
SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

NF-κB	Nükleer faktör kappa B
PKMH	Periferal kan mononükleer hücre
AP-1	Aktivatör protein 1
IgE	Immunoglobulin E
IgM	Immunoglobulin M
IgG	Immunoglobulin G
IL	İnterlökin
TRAF	TNF-reseptör ilişkili faktör
MHC	Majör histokompetabilite kompleksi
LPS	Lipopolisakkarit
mCD14	Membrana bağlı CD14
sCD14	Solubl CD14
TLR	<i>Toll like receptor</i>
LBP	Lipopolisakkarid bağlayıcı protein
TNF	Tümör nekrozis faktör
IFN	Interferon
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
ECP	Eozinofilik katyonik protein
PMN	Polimorfonükleer lökosit
OR	Odds oranı
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
RFLP	Parça uzunluğu değişkenliği analizi
TGF	Transforming growth factor

TABLÖLAR

Tablo no	Sayfa no
Tablo 3.1. Kaplayıcı antikor ve belirleyici antikor konsantrasyonları	31
Tablo 4.1 Hastaların CD14 C159T polimorfizmine göre demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları	37

ŞEKİLLER

Şekil no	Sayfa no
Şekil 2.1. IgE izotip sınıf değişimine yol açan T/B hücre etkileşimleri	6
Şekil 2.2. IL-4 ve IL-13 reseptörlerinin yapısı	8
Şekil 2.3. Lipopolisakkarid molekülünün yapısı (A).CD14 sinyali yolağı (B)	9
Şekil 2.4. Lipopolisakkarit CD14, TLR4 ve LBP aracılığı ile monositte NF-kB ve AP-1(<i>Activator protein-1</i>) yolağını uyarır.	11
Şekil 2.5. İnsan popülasyonlarında gen-çevre etkileşimi	20
Şekil 2.6. Astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizmine göre serum total IgE düzeyleri	22
Şekil 2.7. Astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizmi, C baskın (<i>dominant</i>) modele göre serum total IgE düzeyleri	23
Şekil 2.8. CD14 C159T polimorfizmine göre uyarılmamış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde a) CD14 mRNA ekspresyonu b) sCD14 seviyeleri	24
Şekil 2.9. CD14 C159T polimorfizmine göre uyarılmamış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde a) IL-10 mRNA ekspresyonu b) IL-10 seviyeleri c) LPS uyarısı öncesi ve sonrası IL1 β seviyeleri	25
Şekil 3.1. CD14 C159T genotipleme	28
Şekil 4.1. CD14 C159T polimorfizmi, CC genotipi; IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri	38
Şekil 4.2. CD14 C159T polimorfizmi, TT genotipi; IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri	39
Şekil 4.3. IL-2, IL-4 ve CD40L ile stimülasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması	39
Şekil 4.4. CD14 C159T polimorfizmi, CC genotipi; LPS 2 ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri	40

- Şekil 4.5. CD14 C159T polimorfizmi, T aleli; LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri 41
- Şekil 4.6. LPS 2 ve 200 ng/ml ile stimülasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması 42
- Şekil 4.7. LPS 2 ng/ml ve 200 ng/ml ile uyarıldığında hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması 42
- Şekil 4.8. LPS 2 ng/ml ve 200 ng/ml ile uyarı sonrası 5. gün hücre kültürlerinde IgE mRNA ekspresyonları 43
- Şekil 5.1. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve sensitizasyon arasındaki ilişki 46
- Şekil 5.2. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve spesifik IgE pozitifliği arasındaki ilişki 47
- Şekil 5.3. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve serum total IgE değerleri arasındaki ilişki 48

GİRİŞ VE AMAÇ

Astım çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu çalışma, çevresel bir faktör olan endotoksin ile CD14 molekülünü kodlayan gende sık görülen ve CD14 sentez düzeyini etkileyen bir değişkenliğin IgE sentezi üzerine olan etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.

Konuyla ilgili ilk çalışmamızda astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T lokusunda TT genotipine sahip olmanın düşük serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğu ve ilişkinin atopik astımlılarda daha belirgin olduğunu; (Sackesen ve ark., 2005) mekanizmaya yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz bir diğer çalışmada ise TT genotipinde hücre kültürü süpernatantlarında IL-1 β düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptadık (Keskin ve ark., 2006). Şimdiki çalışmamızı genotip ve IgE arasındaki ilişkinin moleküler ve hücresel mekanizmalarını araştırmak için gerçekleştirdik.

Gram negatif bakterilerin hücre duvarının yapısında bulunan ve yaşanan çevrede yaygın olarak saptanan endotoksinin IgE sentezi üzerine olan etkilerini hücresel ve moleküler düzeyde araştırmak, astım hastalığının çevresel faktörlerle etkileşimi ve hastalık patogenezi hakkında yeni bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca, farklı CD14 genotipleri arasındaki karşılaştırmalar gen-çevre etkileşim konusunda yeni verileri ortaya koyacaktır.

GENEL BİLGİLER

Astım, birçok hücre ve hücre bileşeninin rol oynadığı kronik, inflamatuvar bir havayolu hastalığıdır. Kronik inflamasyon tekrarlayan hışıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük ataklarına neden olan havayolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilidir. Bu ataklar genellikle akciğerlerde yaygın ama değişken şiddette ve çoğunlukla kendiliğinden veya tedaviyle geri dönüşümlü bir havayolu obstrüksiyonu ile ilişkilidir (GINA 2007). Astım çocuklarda ve erişkinlerde çeşitli klinik fenotiplerde kendini gösteren kompleks bir hastalıktır. Birçok hastada hastalığın başlangıcı çocukluk yaşlara dayanır ve genetik ve çevresel faktörler hastalığın başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunurlar (Cookson ve ark.,1999; Stein ve ark., 1999).

Astımın yeryüzünde 300 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Çocuklarda ve erişkinlerde astım ve hışıltılı solunum hastalığının prevalansını ölçmek için uygulanan standart yöntemlere dayanılarak, astımın küresel prevalansının dünyanın farklı ülkelerinde yaşayan toplumlarda %1 ile %18 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Masoli ve ark., 2004) İngiltere, Avustralya gibi bazı ülkelerde çocukluk çağında %25'i geçen astım prevalansı saptanmıştır (Eder W ve ark., 2006). Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde de prevalansı artmaktadır. Bu artışın nedenleri toplum ve tıp personelinin artmış bilgi ve tecrübesi, hızla değişen çevresel özellikler, hızlı ekonomik gelişim ve hava kirliliğinde artış olabilir.

Astım patogenezinin temellerine ait bilgilerimiz özellikle son 25 yılda oldukça değişmiş ve genetik yapı ve klinik özellikler arasında daha iyi ilişkiler kurulmuştur (Busse and Lemanske 2001). Altta yatan değişken hava yolu inflamasyonu, hastalığın aralıklı veya sürekli, akut veya kronik bulguları gibi farklı yönlerini açıklar. Astımın akut semptomları bronkospazmdan kaynaklanır ve bronkodilatör tedaviye yanıt verir. Akut ve kronik inflamasyon havayolu çapını ve hava akımını azaltmanın yanında bronş obstrüksiyonuna yatkınlığı artıran bronş aşırı duyarlılığına da yol açar. Anti-inflamatuvar ilaçlarla tedavi kullanıldığı sürece bu süreçlerin büyük kısmını tersine çevirebilir fakat tedaviye başarılı yanıt haftalar gerektirebilir (Bateman ve

ark., 2004). Bazı hastalarda kronik inflamasyonun gelişmesi “havayolu remodelingi” olarak da bilinen havayolu yapılarında geri dönüşümsüz değişikliklere neden olabilir. Bu kalıcı değişiklikler varolan tedavilere yanıtızsızdır (Holgate and Polosa, 2006).

Astımdaki inflamatuvar cevabın en önemli parçası pulmoner salgılarda veya bronkoalveolar lavaj sıvısında inflamasyonu ve kemotaktik kemokinleri yönlendiren sitokinlerin varlığıdır. Bu sitokinler ve kemokinler hücre aktivasyonunda rol alır ve otokrin, parakrin ve endokrin düzeyde hücreler arası sinyal iletimini sağlar. Bazı sitokinler genlerin promotor bölgelerine bağlanan protein yapısındaki transkripsiyon faktörlerini aktive ederek inflamatuvar cevabı başlatırlar. Astıma bağlı inflamasyonda yer alan transkripsiyon faktörleri nükleer faktör kappa B (NF- κ B), aktive T hücrelerinin nükleer faktörü, siklik AMP cevap (*response*) element bağlanan (*binding*) protein (C/EBP) ve STAT (*signal transducer and activator of transcription*) ailesinin çeşitli üyelerini içermektedir. Bu transkripsiyon faktörleri sitokinleri, kemokinleri, adhezyon moleküllerini ve inflamasyonu artıran ve sürekliliğini sağlayan diğer proteinleri kodlayan genler üzerinde etkilidirler (Chung ve Barnes, 1999).

2.1. Hijyen hipotezi

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde allerji, astım ve egzema gibi IgE aracılıklı hastalıkların prevalansında artış oldukça dikkat çekmektedir. Batılı tarzda yaşam stilinin artması ile hijyenin düzelmesi, antibiyotik kullanımının yaygınlaşması, aşılanma, aile yapısının küçülmesi ve çocuk sayısının azalmasının normalde doğum sonrası beklenen Th2 immün yanıtı Th1'e kayma yerine İnterlökin (IL)-4, IL-5, IL-13 sitokinlerle karakterize Th2 immün yanıtın devam etmesine neden olduğu ve bu nedenle allerjik hastalıkların prevalansının arttığı ileri sürülmüştür. Değişen yaşama alışkanlıklarının ve çevresel koşulların allerjik hastalık sıklığını etkilediğinden yola çıkarak “hijyen hipotezi” ortaya atılmıştır. Çalışmalar virüsler veya bakterilerle belirgin veya sessiz enfeksiyonlar, çevredeki invaziv olmayan mikrobiyal enfeksiyonlarla temas, bu temasların ve enfeksiyonların doğal ve adaptif

immün yanıt üzerindeki etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Von Mutius E, 2007) .

Hijyen hipotezi ile ilişkili bir mekanizma Th1/Th2 dengesinin allerjiyi artıran Th2 hücrelerinden Th1 hücrelerine kayışıdır (Romagnani, 2004). Th1/Th2 dengesi ve allerjik hastalıklar arasındaki en önemli hücresel ürün IgE'dir, Th2 hücrelerden kaynaklanan Interlökin (IL)-4 ve IL-13, B hücrelerde izotip kaymasına ve böylece artmış IgE yapımına neden olur (Geha ve ark, 2003).

Astım ve IgE arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmada kişilerin yaşları ve atopi durumlarından bağımsız olarak astım prevelansı, yaş ve cinsiyet için standardize edilmiş serum IgE seviyeleri ile bağlantılı bulunmuş ve en düşük IgE seviyelerine sahip insanlarda astım saptanmamıştır. Yazarlar astımın hemen her zaman bir çeşit IgE aracılı reaksiyonla ilişkili olduğu ve bu nedenle allerjik bir zeminin bulunduğu sonucuna varmışlardır (Burrows ve ark., 1989).

Bu açıklamalarla birlikte önemszenmesi gereken bazı çelişkili bilgiler de vardır. Son yıllarda sadece Th2 ilişkili hastalıklar değil, Th2 immün yanıtta çok Th1 yanıtla ilgili olan Crohn hastalığı, diabetes mellitus gibi otoimmün hastalıklar da artış göstermiştir (Bach, 2002). Ayrıca *in-vitro* veriler ve hayvan çalışmaları, doğal immün sistemin aktivasyonunun sadece Th1 yanıtı artırmadığını, deney koşullarına bağlı olarak Th2 yanıtı da artırabileceğini göstermiştir. Yüksek mikrobiyal yükü olan çevrede yaşayan çocukların periferik kan hücreleri lipopolisakkarid ile uyarıldığında Th1 ve Th2 ilişkili sitokinlerin azaldığı bulunmuştur (Braun-Fahrlander C ve ark., 2002).

Yani, hijyen hipotezi ile ilgili bulgular Th1 ve Th2 immün yanıtla ilişkili hastalıkların oluş mekanizmalarını açıklamakta yeterli değildir. Son yıllarda tanımlanan düzenleyici görevdeki regülatör T hücreler salgıladıkları IL-10 ve TGF-beta ile hem Th1 hem de Th2 yanıtı kontrol altına alabilmekte, enfeksiyöz hastalıklar yanında kronik inflamasyonla seyreden otoimmün hastalıklar ile astımın patogenezinde ve özellikle bu hastalıkların kontrolünde çok önemli rolleri olduğu belirlenmiştir (Akdiş ve ark., 2004).

Sonuç olarak var olan veriler astımın artan sıklığı ile çevresel ve genetik etkileşimi hakkında bilgilerimizin yetersizliğini göstermektedir.

2.2. Astım ve Atopi

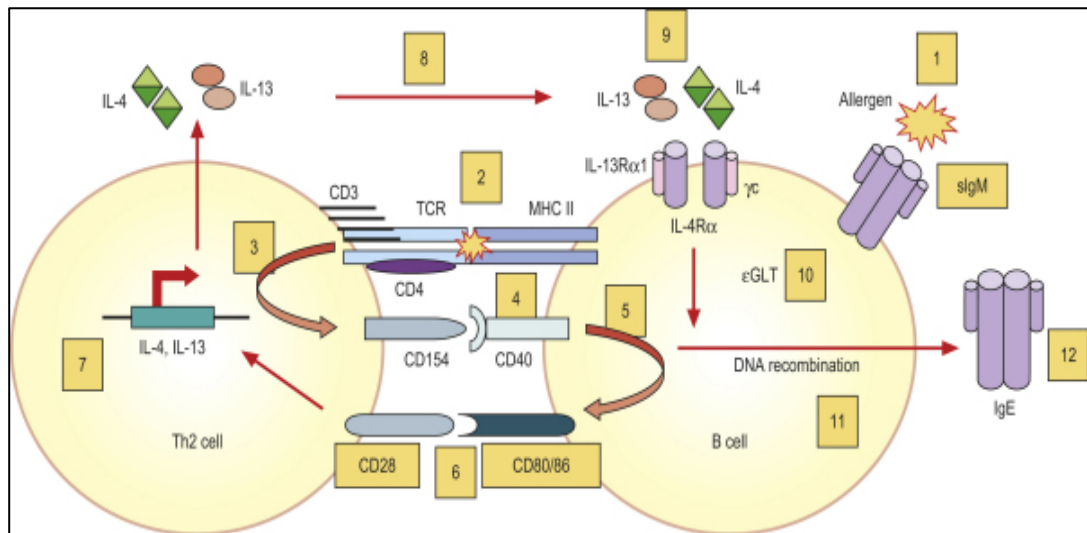
Atopi, kişinin çevresel antijenlere karşı özgül IgE antikorları üretme eğilimidir. Astımın atopi ile ilişkisi uzun yıllardır bilinen bir konudur. Astım, çocukluk çağında %70-80 oranında, erişkinlerde ise daha düşük oranlarda atopi ile ilişkilidir (GINA 2007; Bacharier ve ark., 2008). Burrows ve arkadaşları bu konuda klasikleşmiş çalışmalarında total IgE ve astım arasındaki kuvvetli ilişkiyi ortaya koymuşlar ve allerjik olmadığı düşünülen “intrensek” astımda dahi bir allerjik komponent olduğunu öne sürmüşlerdir (Burrows ve ark.,1989). Nitekim, ilerleyen yıllarda immünopatolojik çalışmalar da sistemik anlamda allerjik bağlantısı gösterilemeyen astımda dahi lokal olarak artmış IgE sentezi ile kendini gösteren bir allerjik immün yanıtın varlığını ortaya koymuştur (Ying ve ark., 2001) Son yıllarda ağır astım tedavisinde kullanılmaya başlanan anti-IgE monoklonal antikorlu ile elde edilen klinik başarılar IgE’nin astım patogeneziindeki önemini yeniden vurgulamıştır (Fahy, 2006)

2.3. Immunoglobulin E ve regülasyonu

Epidemiyolojik ve klinik gözlemler, immunoglobulin E (IgE) antikor miktarı ile astım şiddetinin ve solunum yollarının allerjenlere karşı olan erken ve geç cevabı arasında bağlantı olduğunu öne sürmüştür (Burrows ve ark.,1989). IgE sentezinin başlatılması için, solunumla alınmış olan allerjenin, dendritik hücrelerle karşılaşması gerekir. Daha sonra bu dendritik hücreler, işlemiş oldukları antijeni T hücrelerine sunmak üzere lenf düğümlerine göç ederler (Noah ve Becker, 2000). Aktive T hücreleri salgıladıkları IL-4 ve IL-13 aracılığı ve B hücreleri ile temas etmeleri sonucu IgE sentezini sağlarlar. B hücrelerinin IgE izotipini oluşturmak üzere değişimi, iki sinyale gereksinim duyar. CD40 ve CD40 Ligand bağlanması ile B hücreleri uyarılır ve sonra IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile *ε-germline* transkripsiyonu gerçekleşir.

2.3.1. CD40 sinyali

CD40/CD40L sinyali, immüoglobülin izotip değişimi için oldukça önemlidir. T hücre yüzeyinde yer alan CD40L (CD154), T hücre reseptörlerinin antijen/MHC kompleksi tarafından uyarılmasının ardından aktive olur. CD40L/CD40 bağlanması TNF-reseptör ilişkili faktörler (TRAFs) aracılığı ile sinyal iletimini başlatır. TRAF aktivasyonu NF- κ B'nin, inhibitörü olan I κ B'den ayrılarak aktive olmasına ve nükleusa translokasyonuna neden olur. Diğer ligand-reseptör çiftleri (CD28 ile CD80/CD86 arasındaki ve $\alpha_L\beta_2$ integrin ile hücre içi adhezyon molekülü 1 arasında ligand-reseptör bağı) B hücrelerinin T hücre bağımlı aktivasyonununa katkıda bulunur (Bacharier ve ark.,1998) (Şekil 2.1).

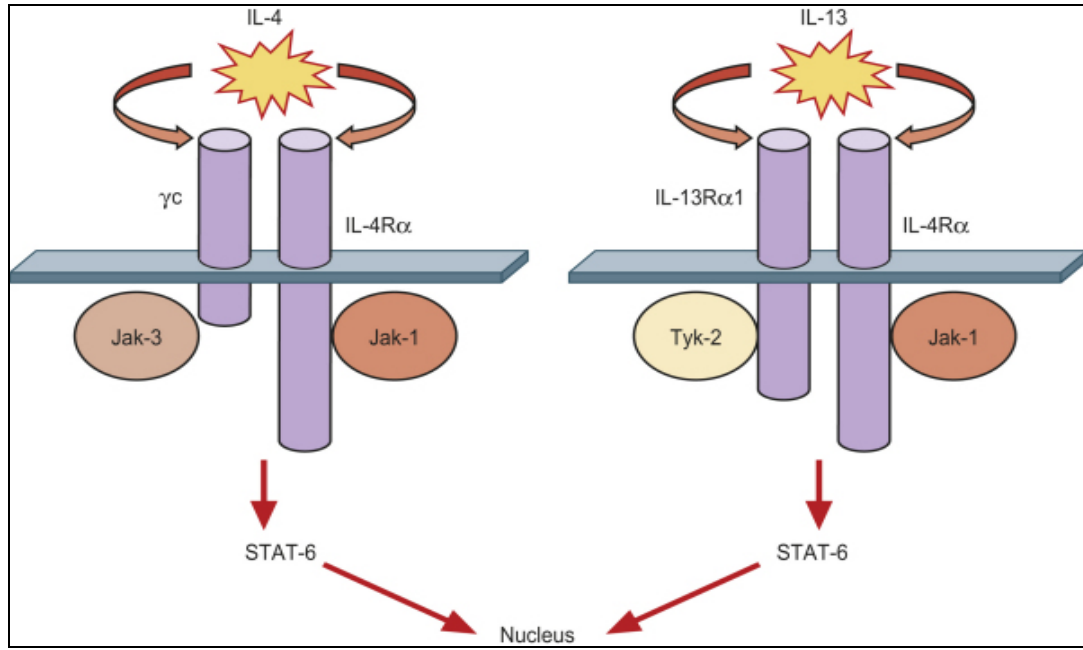


Şekil 2.1. IgE izotip sınıf değişimine yol açan T/B hücre etkileşimleri. 1. B hücre yüzey immunoglobulinleri (slgM) ile allerjene bağlanır ve 2. Allerjene özgül Th2 hücrelerine sunar. 3. T hücre reseptörü/CD3 kompleksinin MHC sınıf II molekülleri ile birleşmesi CD40L (CD154)'ın hızlı ekspresyonu ile sonuçlanır. 4. CD40L (CD154), B hücre üzerindeki CD40 ile etkileşir ve 5. B hücre üzerindeki CD80/CD86 ekspresyonunu artırır. 6. CD80/CD86, CD28'e bağlanarak 7. IL-4 ve/veya IL-13'ün yüksek hızlı transkripsiyonunu ve 8. salınımını tetikler. 9. IL-4 ve IL-13 sitokinleri B hücre yüzeyinde heterodimerik reseptörlerine bağlanır. 10. IL-4 B hücrelerinde ϵ germline transkripsiyonunu uyarır. 11. CD40'ın CD40L'a bağlanması hedeflenmiş ϵ S

bölgesine DNA rekombinasyonunu aktive eder ve 12. IgE izotip sınıf değişimi ve allerjene özgül IgE sekresyonu olur. [Vercelli D (2008). Immunobiology of IgE. "Middleton's Allergy, Principle and Practice" (Ed. NF Adkinson, BS Bochner, WW Busse, ST Holgate, RF Lemanske, FER Simons) Elsevier Inc., Philadelphia, s:115-128].

2.3.2. IgE Sentezinde IL-4, IL-13 Sitokin ve Reseptörlerinin Rolü

IL-4 ve IL-13 varlığının ϵ -germline transkripsiyonu için yeterli olduğu B hücre kültürlerinde gösterilmiştir. IL-4 ve IL-13 reseptörleri multimerik yapıdadır ve IL-4R α zincirleri her ikisinde ortaktır (Wills-Karp ve ark.,1998). IL-4 reseptörleri ile başlatılan sinyal iletiminin ilk basamağını Tirozin kinaz ailelerinden biri olan Janus kinazların (JAK) aktivasyonu oluşturur. Tirozin rezidülerinden fosforile olan JAK, STAT6 molekülü ile bağlanır ve STAT6 molekülünün fosforilasyonuna neden olur. Fosforile olan STAT6 molekülü dimerize olarak nükleusa hareket eder. STAT6, çeşitli genlerin promotor bölgelerinde yer alan özgül dizilere bağlanarak bunların transkripsiyonuna neden olur. IL-4 veya IL-13'ün tetiklediği STAT6 aktivasyonu, C ϵ lokusunda RNA transkripsiyonunu da tetikler. I ϵ promotorunda STAT6 bağlanma bölgesinin dışında nükleer faktör κ B (NF- κ B), Pax5 ve C/EBP için de bağlanma bölgeleri vardır. CD40 bağlanması, NF- κ B aktivasyonuna neden olur ve ϵ -germline transkripsiyonunu artırır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. IL-4 ve IL-13 reseptörlerinin yapısı. IL-4 ve IL-13 reseptörlerinin aktivasyonu STAT6 fosforilasyonu ve nükleer translokasyon ile sonuçlanır. [Vercelli D (2008). Immunobiology of IgE. “Middleton’s Allergy, Principle and Practice” (Ed. NF Adkinson, BS Bochner, WW Busse, ST Holgate, RF Lemanske, FER Simons) Elsevier Inc., Philadelphia, s:115-128].

IgE antikorları B hücreleri tarafından sentezlenip salgılandıktan sonra, dokudaki mast hücreleri veya periferik kan bazofilleri üzerinde yer alan yüksek afiniteli IgE reseptörlerine (Fc ϵ RI) ve lenfosit, trombosit, eozinofil, makrofaj ve diğer pekçok hücrenin yüzeyinde yer alan düşük afiniteli IgE reseptörlerine (Fc ϵ RII) bağlanmadan önce, kısa bir süre kanda dolaşır. Allerjen reseptöre bağlı IgE molekülü ile bağlandığı zaman oluşan Fc ϵ RI reseptörlerinin moleküler köprüleşmesi, hücrelerin aktivasyonuna sebep olur ve önceden var olan veya yeni sentezlenen mediatörlerin salınımına neden olur. (Oettgen ve Geha, 2001)

2.4. Hijyen Hipotezi ve endotoksin

Çevresel temaslar: Kırsal alanlarda yaşayan ve sıklıkla hayvanlarla temasta bulunan çocukların aynı bölgelerde yaşayan fakat hayvanlarla temasta bulunmayan çocuklara kıyasla oldukça düşük oranda astım ve

allerji oldukları çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Von Ehrenstein ve ark., 2000, von Mutius ve ark., 2000). Doğal hayatla temasın zamanı önem taşır çünkü hayatın ilk yıllarında olursa korunma en güçlüdür (Riedler ve ark., 2001). Bu çevrelerde bazı mikrobiyal temaslar ölçülmüştür. Örneğin çiftlikte yaşayan çocukların yataklarında gram negatif bakterilerden endotoksin ve tüm bakterilerden muramik asit gibi bakteriyel ürünler çiftlikte yaşamayan çocuklara kıyasla daha fazla bulunmuştur.

Endotoksin atopi ve ilişkili durumlarla ters ilişkili görünse de nonatopik astım, havayolu aşırı duyarlılığı ve düşük akciğer fonksiyonları için risk faktörüdür (Braun-Fahrlander C ve ark., 2002). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada allerjen ile karşılaşmadan önce veya aynı esnada LPS ile karşılaşmanın allerjen sensitizasyonunu baskıladığı ancak allerjenle daha önceden sensitize edilmiş olan hayvanın LPS ile karşılaşmasının allerjik inflamasyonu artırdığı gösterilmiştir (Tulic ve ark., 2000).

Özetlenecek olursa endotoksin ile karşılaşmanın allerjik hastalıklar üzerine olan etkisi endotoksine maruziyetin zamanına, süresine ve karşılaşılan endotoksin miktarına ve endotoksin ile karşılaşma anında yerleşik olan immün yanıtın özelliğine bağlı olarak değişmektedir.

2.5. Endotoksin: Hücresel etkileri ve astımdaki rolü

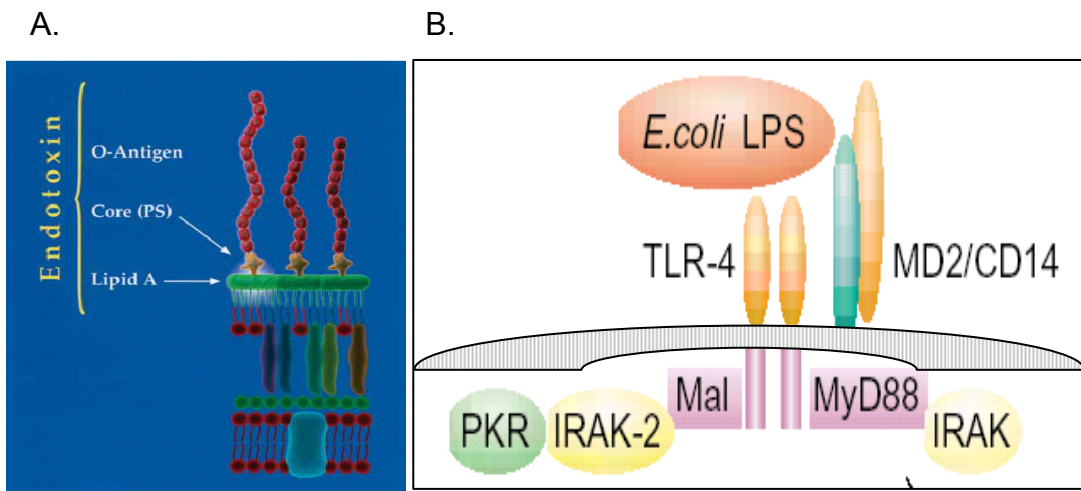
2.5.1. Endotoksin ve endotoksin reseptörü olan CD14'ün yapısı ve özellikleri

Endotoksin gram-negatif bakterilerin dış yüzeyinde bulunur. Hemen her yerde, hatta ev tozunda, sütte, çeşme suyunda da bulunabilir. Lipopolisakkarit (LPS) endotoksini oluşturan ana kısımdır. LPS, fosfoglikolipit yapısındaki lipid A ve buna bağlı heteropolisakkarit yapısından oluşmaktadır (Şekil 2.3.A). İmmün stimülatör özelliği, lipid A kısmından kaynaklanmaktadır. Çeşitli tip LPS reseptörleri tanımlanmıştır. Bu reseptörlerden en önemlisi CD14 molekülüdür.

CD14, 55 kD büyüklüğünde bir glikoprotein olup, monosit, makrofaj ve az miktarda nötrofiller tarafından sentezlenmektedir. CD14 molekülünün membrana bağlı (mCD14) ve ekstraselüler olarak bulunan çözünmüş formu

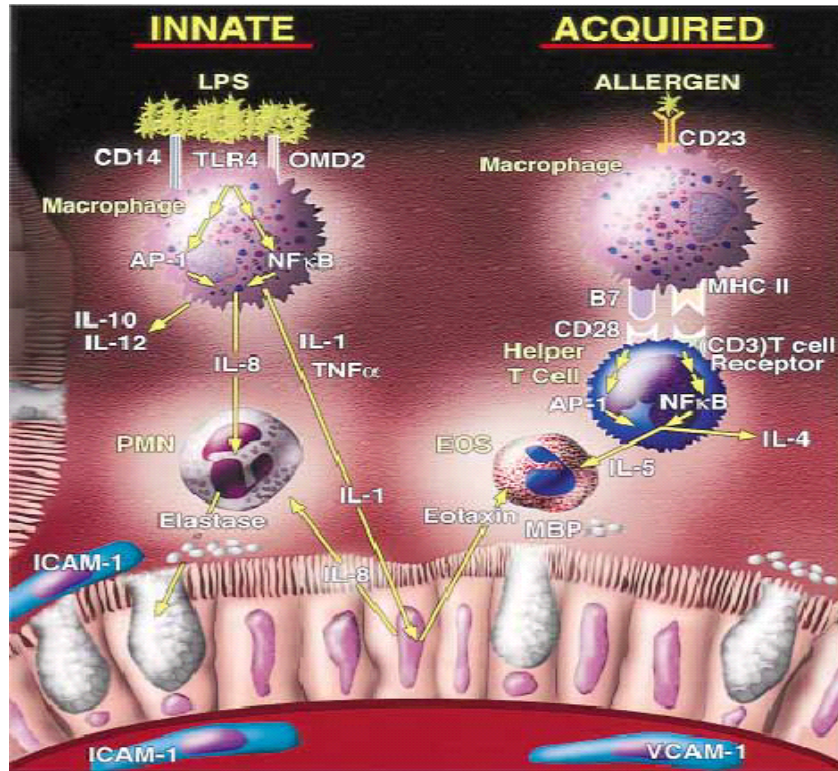
(sCD14) olmak üzere iki formu vardır. mCD14 myeloid hücre aktivasyonuna neden olurken LPS ile kompleks oluşturan serbest formu epitel ve endotel hücreleri gibi myeloid kökenli olmayan hücreleri uyarmaktadır (Liu ve ark., 2008). Striz ve arkadaşları epitel hücrelerden IL-6 ve IL-8 salınımının bu yolla gerçekleştiğini göstermişlerdir (Striz ve ark., 1998).

CD14 molekülü sitoplazmik kısım içermez, bu nedenle tek başına sinyal iletimini gerçekleştiremez. CD14 molekülü sinyal iletimini *Toll like* reseptör TLR4 aracılığı ile gerçekleştirir (Şekil 2.3.B).



Şekil 2.3 Lipopolisakkarid molekülünün yapısı (A). CD14 sinyal yolağı (B)

Lipopolisakkarit, CD14 molekülüne lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP) aracılığı ile bağlanır. LBP plazmada serbest olarak dolaşır ve lipid A molekülüne bağlanarak düşük konsantrasyondaki LPS'in makrofajları aktive etmesini kolaylaştırır. LBP aracılığı ile CD14 molekülüne bağlı olan LPS molekülü TLR reseptöründe yer alan ve patojenle ilgili moleküler bazı yapıları (Pathogen associated molecular pattern, PAMPs) tanıyan bölgeler aracılığı ile tanınır ve MD-2 kompleksi sayesinde sinyal yolağı aktive edilir. IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokin üretimi, TNF- α tarafından MyD88 gibi aksesuar moleküllerin uyarımı ve NF- κ B uyarımı gibi pek çok olay TLR4'ün intrasitoplazmik kısmında yer alan TIR domeyni sayesinde tetiklenmektedir (Reed ve Milton, 2001) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Lipopolisakkarit CD14, TLR4 ve LBP aracılığı ile monositte NF-κB ve AP-1 (*Activator protein-1*) yolağını uyarır. LPS ile uyarılan hücreden pro-inflamatuar sitokinler salınır. (Reed C, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 157-66)

CD14 ekspresyonu çeşitli sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Bunların başlıcaları IL-4, IL-13 ve IL-10'dur. Donata Vercelli ve arkadaşları IL-4'ün CD14 ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde inhibe ettiğini, IL-13'ün ise monositlerden CD14 aracılıklı TNF-α salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir (Lauener ve ark., 1990; Cosentino ve ark., 1995).

2.5.2. Endotoksinin hücresel düzeyde etkileri

Endotoksinin hücresel düzeyde etkilerini araştıran pek çok sayıda makale vardır. Bunlardan bazıları çelişkili sonuçlar da bildirmiştir.

Endotoksin, Th1 tip immünite gelişiminde anahtar rol oynayan sitokinler olan IL-12 ve IFN- γ sentezini indükler (D'andrea ve ark.,1992). LPS doğal antijen sunan hücreleri özellikle dendritik hücreleri kuvvetle etkiler ve IL-12 salınımına neden olur. Ayrıca T hücrelerinin primer olarak IFN- γ sentezleyen efektör hücrelerine dönüşümünü de uyarır. IFN- γ üretimi IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi Th2 tip sitokin üretimini inhibe eder. LPS ayrıca çeşitli hücrelerden IL-10 üretimini de uyarır. Endotoksin tarafından oluşturulan Th1 tipi immün yanıtın astımın patolojik belirtilerini aşağıda belirtilen olası mekanizmalarla engellediği öne sürülmektedir (Liu, 2002);

- 1- Allerjik inflamasyonu baskılamak,
- 2- Mukus bezlerinin hipertrofisini ve hiperplazisini baskılamak,
- 3- Fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini engellemek,
- 4- Hava yollarında mast hücrelerinin sayısının artımını ve proliferasyonunu baskılamak,
- 5- Epitelin bütünlüğünün korunmasını uyarmak

Dubin ve arkadaşları, astımlı bireylerde allerjenle karşılaşmadan hemen sonra bronkoalveolar kompartımanlarda LBP ve sCD14 molekülünün oldukça yüksek değerlere ulaştığını göstermişlerdir. LPS ile indüklenen makrofajların daha fazla IL-1 β ve TNF- α salgıladıkları hatta bunun yanı sıra uyarılabilen nitrik oksit ve NOS2'de de artış olduğu gözlemlenmiştir (Steege ve ark.,1998). LPS'in nötrofillerin bronş lümenine geçişini uyardığı ve PKMH'lerden GM-CSF üretimini artırarak eozinofillerin yaşam sürelerini uzattığı gösterilmiştir (Nightingale ve ark.,1998; Jatakanon ve ark.,1999).

Alexis ve arkadaşları atopik astımlı bireylerden ve sağlıklı kontrollerden düşük dozda LPS inhalasyonu sonrasında indükte balgam örneği toplamış ve total hücre sayısında ve farklı hücre gruplarındaki hücre sayısındaki değişimi ve sCD14, eozinofilik katyonik protein (ECP) ve IL-8 miktarındaki değişimi incelemişlerdir. Hem kontrollerde, hem de astımlılarda toplam polimorfonükleer lökosit (PMN) sayısında artış gözlenmiştir. LPS ayrıca sCD14 ve mCD14 artışına da neden olmuştur ve

hücre sayısındaki artış ile CD14 ekspresyonundaki artış arasında paralellik saptanmıştır (Alexis ve ark., 2001).

Gerhold ve arkadaşları farelere ovalbümin ile sensitizasyondan önce sistemik olarak LPS verilmesinin OVA spesifik IgE oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. Allerjen ile provokasyondan önce lokal olarak LPS verilmesinin peribronşiyal lenf nodlarından IFN- γ salınımını arttırdığı gözlenmiştir. LPS'in allerjen sentisizasyonu ve eozinofilik inflamasyon üzerine olan etkisi LPS stimülasyonundan önce anti IL-12 antikoruna ilavesi ile baskılanmıştır (Gerhold ve ark., 2002).

Riedler ve arkadaşlarının klinik çalışmasında (*ALEX Study*) çiftlik ortamında yaşayan ve yaşamayan çocuklarda serum allerjen spesifik IgG alt grupları ve IgE düzeyleri araştırılmıştır. Çiftlikte yaşamın ilk yılından itibaren yoğun LPS/endotoksin ile karşılaşan çocuklarda çayır poleni (*Phlaeum pratense*) özgül IgE düzeyleri anlamlı olarak daha düşük ($p<0.001$) bulunmuştur (Riedler ve ark., 2001).

Başka bir araştırmada da LPS ile stimülasyonunun, Th1 sitokinlerin, özellikle de IFN- γ 'nın salınımını artırdığı ve Th2 sitokinlerin salınımı azalttığı gösterilmiştir (Tulic ve ark., 2002). Rey Nores ve arkadaşları sCD14'ün ortamda LPS olmasa da aktive T hücrelerle direkt olarak etkileştiğini, antijen miktarında ve mitojenle aktive olan hücre proliferasyonunda azalmaya neden olduğunu ve sCD14'ün bu etkisinin IL-2 ekspresyonunda azalmaya neden olması ile ilişkili olduğu ve ortama dışardan IL-2 ilavesiyle bu etkinin ortadan kalktığını göstermişlerdir. Bu çalışmada sadece IL-2 değil IFN- γ ve IL-4 gibi diğer Th1 ve Th2 sitokinlerin ekspresyonunda da azalma gözlenmiştir. sCD14'ün CD25 ekspresyonunda belirgin bir artışa neden olduğu yine bu çalışmada elde edilmiş önemli bulgulardan biridir. Nores ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışma sCD14'ün T hücre aktivasyonu ve fonksiyonu için negatif regülatör element olduğunu göstermektedir (Rey Nores ve ark., 1999).

Arias ve arkadaşları ise B hücrelerinin %24-60'ının sCD14 molekülü ile direkt olarak bağlanabildiğini ve bu bağlanmanın T hücrelerin CD40L ekspresyonunda ve B hücrelerinin IgG1 sentezinde artışa, IgE sentezinde

ise azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. sCD14'ün B hücre yüzeyine bağlanmasının IL-6 ekspresyonunu inhibe ederek CD40 ve IL-4 bağımlı IgE sentezini bloke ettiği düşünülmektedir (Arias ve ark., 2000).

Eisenbarth ve arkadaşlarının fare çalışmasında inhalasyon yoluyla OVA ile sensitize edilen fareler düşük (0.1 mcg/doz) veya yüksek (100 mcg/doz) LPS ve OVA ile *challenge* yapılmıştır. OVA düşük doz LPS ile verildiğinde BAL'da inflammatuar hücre sayısı, mukus yapımı ve eozinofil sayısında artış saptanmıştır. OVA yüksek doz LPS ile verildiğinde nötrofil hakim Th1 yanıtı uyarılmakta ve mukus yapımı etkilenmemektedir. OVA eşliğinde LPS verilmediğinde ise solunum yollarında inflamasyon gelişmemiştir. Bu çalışma solunum yolları ile alınan allerjenlere LPS eşlik ettiğinde inflamasyon olduğunu ve LPS dozunun inflamasyon tipini belirlediğini ve bu uyarının TLR4 aracılığı ile olduğunu göstermiştir (Eisenbarth ve ark., 2002).

2.5.3. Endotoksin: Allerjik hastalıklar ile ilişkisi ve IgE sentezi üzerine etkileri

Bugüne kadar endotoksin ve allerjik hastalıklar arasındaki ilişkiyi açıklamak için birçok çalışma yapılmış ve yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan epidemiolojik araştırmalar yüksek oranda çevresel endotoksine erken yaşlarda maruziyetin (erken karşılaşma) allerjik sensitizasyona karşı bir koruma oluştururken daha ileri yaşlardaki maruziyetin (geç karşılaşma) var olan astımın şiddetlenmesine neden olduğunu düşündürmektedir:

Erken karşılaşma: Braun-Fahrlander ve arkadaşlarının İsviçre'de yaşları 6 ile 15 arasında değişen 1620 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada çiftçi ailelerinin çocuklarının daha az sıklıkta nezle olduğu, polen sezonu boyunca daha az sıklıkta burun akıntısı olduğu ve saman nezlesi oldukları gösterilmiştir. Ayrıca çiftçi çocuklarında kapalı mekanlardaki ve dış ortamlardaki antijenlere karşı oluşan allerjene özgü antikor miktarının da daha az olduğu gösterilmiştir (Braun-Fahrlander ve ark., 1999). Avusturya, Almanya ve İsviçre'nin katılmış olduğu ALEX (Allerji ve endotoksin)

çalışması yaşamın ilk yıllarında pastörize olmayan çiftlik sütü içmenin ve ahırla temas etmenin astıma karşı korunma sağladığını ortaya koymuştur (Riedler ve ark., 2001). Bütün bu çalışmalar endotoksinin koruyucu etkisinin erken yaşlarda ortaya çıktığına işaret etmektedir.

Geç karşılaşma: Kapalı mekanlardaki endotoksin miktarı ile akciğer fonksiyonları arasında ters ilişki saptanırken oral ve inhale steroid ve inhale β -agonist kullanımı arasında paralellik saptanmıştır (Michel ve ark., 1996). Astım semptomları ve astımın şiddeti ile endotoksin maruziyeti arasında pozitif ilişki belirlenmiştir. Ev tozu endotoksin seviyeleri ile çocukluk çağı astım şiddeti arasında da pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir (Rizzo ve ark., 1997).

Hücresel düzeyde, periferik kan mononükleer hücreler ve pürifiye B hücreleri CD14 antikoru ile muamele edildikten sonra Ig sentezi RAST yöntemi kullanılarak araştırıldığında IgE de dahil olmak üzere tüm Ig'lerin sentezinde azalma saptanmıştır (Jabara ve Vercelli, 1994).

CD14 geninin IgE lokusuna çok yakın yerleşim göstermesi nedeni ile bu gende olabilecek fonksiyonel mutasyonların IgE sentezi üzerinde etkisi olabileceği düşünülmüş ve CD14 geni promotor bölgesinde yer alan çeşitli mutasyonlarla serum sCD14 ve total IgE arasındaki bağlantı araştırılmıştır.

2.6. CD14 genetik değişkenlikleri ve IgE sentezi üzerine olan etkileri

Bu konudaki öncü çalışmada Baldini ve arkadaşları Tucson bölgesinde genel populasyonu temsil eden 481 çocukta CD14-159 polimorfizminin sıklığını ve IgE sentezi üzerine etkisini araştırmışlar ve TT homozigotlarda dolaşımda sCD14 miktarının artmış olduğunu aynı zamanda bu bireylerde IgE miktarının azalmış olduğunu belirlemişlerdir (Baldini ve ark., 1999).

Vercelli ve arkadaşlarının yine Tucson'da 11 yaşlarındaki 265 çocuk ile yaptıkları çalışmada CD14 promotorunda -1359TT/-1145AA/-159CC haplotipine sahip çocukların daha yüksek serum IgE ve daha düşük sCD14 seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Vercelli ve ark., 2001). Bu çalışma

aynı zamanda sCD14 ile IgE sentezi arasındaki negatif korelasyona rağmen, IL-4 aracılıklı IgE sentezinin LPS uyarısıyla arttığını ve anti CD14 antikoru ile bu etkinin baskılandığını ortaya koymuştur. IL-4 ve IL-13, IgE sentezini artırırken hem mCD14 hem de sCD14 miktarında azalmaya neden olmaktadır. Öte yandan LPS stimülasyonu, CD14 ekspresyonunu artırarak IL-12 ve IL-18 ekspresyonunda artışa neden olmakta ve Th2 farklılaşmasını inhibe ederek IgE sentezini de baskılamaktadır. Tüm bu bulgular farklı çevresel faktörlerin tetiklediği ve genetik faktörlerin de etkileyebileceği kompleks bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir.

LeVan ve arkadaşları bu polimorfizmin gen regülasyonu üzerine etkisini belirlemek için polimorfik bölgeyi de içeren CD14 yakın promotor bölgesi tarafından yönlendirilen lusiferaz taşıyıcı (*reporter*) vektör hazırlayarak yabanıl ve mutant promotor dizisinin promotor aktivitelerini incelemişlerdir. Geçici transfeksiyon deneylerinde T allelini taşıyan promotor dizisinin C allelini taşıyandan daha aktif olduğu bulunmuştur. Promotor bölgesinde yer alan bu polimorfizmin transkripsiyon faktör ailesi Sp proteinleri için bağlanma afinitesini değiştirdiği EMSA deneyleri ile gösterilmiştir. T allelinin baskılayıcı özellik taşıyan Sp3 için bağlanma afinitesini azalttığı, SP3/(Sp1+Sp2) oranının bu iki alellin transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu saptanmıştır (LeVan ve ark., 2001).

CD14 C159T polimorfizmi ile IgE, atopi ve allerjik hastalıklar arasındaki ilgiyi araştıran çalışmalar IgE düzeylerine göre sınıflandırılarak tek tek gözden geçirildiğinde aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

2.6.1. CD14 -159 TT genotipinin düşük serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar

Baldini ve arkadaşlarının CD14 C159T polimorfizmi, TT genotipinin düşük total IgE düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösterdikleri ilk çalışmasından sonra birçok araştırma bu bulguyu desteklemiştir. Gao ve arkadaşları 300 İngiliz asıllı ve 200 Japon asıllı bireyde 159T/C polimorfizmi ve total IgE arasındaki ilişkiyi incelemişler, TT ve CT genotipine sahip kişilerde ortalama

total IgE seviyesinin CC genotipinden daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Gao ve ark., 1999).

Leung ve arkadaşlarının Çinli atopik çocuklarda yaptığı bir araştırmada CD14 C159T, CC genotipi daha yüksek serum total IgE düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur fakat bu grupta artmış aeroallerjen sensitizasyonu veya astım ile ilişki saptanmamıştır (Leung ve ark., 2003). Çocukların 8-25 yaşlar arasında takip edildiği bir izlem çalışmasında CD14 C159T, CC genotipli adölesanlarda 18 yaşında artmış serum total IgE düzeyleri saptanırken 25 yaşında bu ilişki ortadan kalkmıştır. Ayrıca, CC genotipi erken başlangıçlı atopi ve bronş hipersensitivitesi riskini 2 kat arttırmıştır (O'Donnel ve ark., 2004).

Koppelman ve arkadaşları 159 astımlı bireyde ve kontrol grubu olarak bu kişilerin sağlıklı olan eşlerinde CD14 C159T polimorfizminin astım fenotipi ve atopi ile ilişkisini araştırmışlardır. C allelini homozigot olarak taşıyan bireylerde deri testi pozitifliğinin daha fazla olduğunu ve serum total IgE seviyelerinin daha yüksek olduğunu, bu bireylerin rinit, saman nezlesi gibi allerjik semptomlardan daha fazla şikayetçi oldukları tespit edilmiştir (Koppelman ve ark., 2001). Benzer şekilde Hintli astımlı erişkinlerde CC genotipi, atopik astım ve yüksek serum IgE düzeyleri gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2004). Allerjik rinitli başka bir grupta ise atopik hastalarda CC genotipinin daha fazla deri testi pozitifliği ve yüksek total IgE ile ilişkili bulunmuştur (Kang ve ark., 2006). Takeuchi ve arkadaşları TT genotipine sahip allerjik rinitli hastaların daha az pozitif spesifik IgE değerleri olduğunu rapor etmişlerdir (Takeuchi ve ark., 2005).

2.6.2. CD14 -159 TT genotipinin yüksek serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar

Ober ve arkadaşlarının izole ve doğal ortamda yaşayan "Hutterit" toplumu üzerinde yaptığı çalışmada atopik bireylerde CD14 C259T, TT genotipinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ober ve ark., 2000). CD14 C159T polimorfizminin astım ve besin allerjisi ile ilişkisini incelemeye yönelik başka bir araştırmada besin allerjisi bulunan çocuklarda TT genotipinin

sağlıklı kontrollere göre 4 kat ve nonatopik astımlılarda TT genotipinin 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Woo ve ark., 2003).

Avustralyalı erişkin astımlılar ve atopik ve nonatopik kontrollerin katıldığı kapsamlı bir araştırmada CD14 C159T polimorfizminin astım veya astım şiddeti ile ilişkisi gösterilmemiş, TT genotipine sahip kişilerde atopinin biraz daha sık olduğu saptanmıştır fakat istatistiksel anlam bulunamamıştır ($p=0.084$) (Kedda ve ark., 2005). Jackola ve arkadaşları astımlı ailelerde TT genotipine sahip hastaların ev tozu akarı (Der p 1) özgül IgE değerlerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Jackola ve ark., 2006).

Tayvanlı astımlı çocuklarda ise CD14 C159T polimorfizmi ile serum IgE değerleri arasında bir ilişki bulunamamasına rağmen içinde özel D5S2011 E alleli bulunan haplotip analizinde TT genotipi ile artmış total IgE değerleri arasında ilişki gösterilmiştir (Wang ve ark., 2005).

2.6.3. CD14 -159 TT genotipinin serum IgE düzeyleri ile ilişkili olmadığını gösteren çalışmalar

Bu çalışmaların yanı sıra son zamanlarda Kabesch ve arkadaşları tarafından yapılmış olan geniş bir çalışmada çocuklarda ve erişkinlerde CD14 C159T polimorfizmleri ile sCD14 miktarı arasında ilişki belirlenmiş fakat total IgE ve atopik hastalıklar ile bağlantı gösterilememiştir (Kabesch ve ark., 2004).

Sengler ve arkadaşları, Alman Çok Merkezli Allerji Çalışma kohortunda CD14 C159T polimorfizminin astım, allerjik rinit, atopik dermatit gibi allerjik hastalıklarla ilişkisini saptamamıştır. Ayrıca CC ve TT genotipleri arasında serum total IgE ve besin veya aeroallerjenlere özgül IgE değerleri fark etmemiştir (Sengler ve ark., 2003).

CD14 C159T polimorfizmi ile total IgE ve/veya allerjik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar, gen-çevre etkileşimi ile açıklanmaya çalışılmıştır.

2.6.4. Gen-çevre etkileşimi ve allerjik hastalıklar

Gen-çevre etkileşimi son dönemlerde allerjik hastalıkların farklı ekspresyonlarını açıklamak için de kullanılmıştır. Bouzigon ve arkadaşları, 17q21'de yer alan 36 tek nükleotid polimorfizminden 11 tanesinin astım ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Astım hastalarını astım başlangıcına göre ikiye ayırdıklarında (dört yaştan önce erken başlangıçlı; dört yaştan sonra geç başlangıçlı), erken başlangıçlı astım ile bu SNP'lerin bağlantısının daha kuvvetli olduğunu gözlenmiştir. Hayatın erken döneminde sigara maruziyeti analize dahil edildiğinde rs8069176 ve rs2305480 SNP'lerinin sadece sigara ile teması olan kişilerde erken çocukluk çağı astımına yol açtığı, eğer sigara teması yoksa astım riskini artırmadığı bulunmuştur (Bouzigon ve ark., 2008).

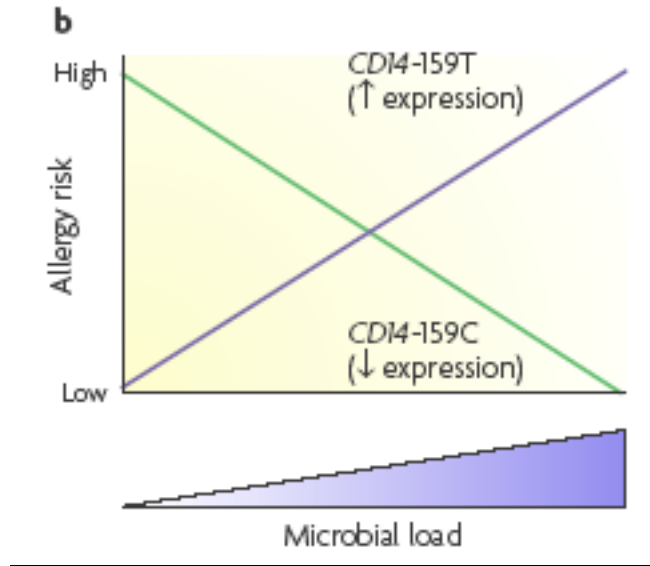
Filagrin, epidermiste yeralan ve derinin bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan bir proteindir. Filagrin geninde fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların epitel bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu ve dolayısıyla çevre temasını artırarak egzema gelişimi artırdığı düşünülmektedir. Bisgaard ve arkadaşlarının İngiltere'de rastgele bir doğum kohortunda yaptığı araştırmada filagrin mutasyonunun yaşamın ilk yılında egzema riskini 2.6 kat, eğer kedi ile temas öyküsü varsa 11.1 kat artırdığını göstermişlerdir. Köpek sahibi olmanın ise koruyucu etkisi varken, ev tozu akarları ile temas için benzer etkiler gözlenmemiştir (Bisgaard ve ark., 2008).

2.6.5. Gen çevre etkileşimi bağlamında CD14 C159T polimorfizmi

CD14 C159T genotipi çevresel mikrobiyal ajanlara maruziyetin sonucunda karşılaşılan endotoksin dozuna göre koruyucu veya risk faktörü olabilir (Martinez, 2007).

Avrupa'nın Alp bölgelerinde yaşayan çocukların CD14 C159T polimorfizmleri ve IgE düzeyleri incelendiğinde, TT genotipinin çocuklar kedi ve köpek ile temas ediyorlarsa koruyucu, ahır hayvanları ile temas ediyorsa yüksek IgE seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur. Çocukların yataklarından alınan toz örnekleri ölçüldüğünde yüksek seviyede ev tozu endotoksinine maruz kalanlarda CC genotipinin hayvan temasından bağımsız olarak daha düşük

özgül IgE değerleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Eder ve ark., 2005) (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. İnsan popülasyonlarında gen-çevre etkileşimi. (Eder W ve ark. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 601-7. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. Nat Rev Immunol. 2008; 8: 169-82.)

Simpson ve arkadaşları İngiltere’de doğum öncesi dönemden itibaren izlemeye başladıkları kohortlarında CD14 C159T polimorfizmlerine göre genotipledikleri çocukları 5 yaşında atopi, egzema ve klinik olarak değerlendirmişler ve çocukların evlerindeki endotoksin maruziyetlerini ölçmüşlerdir. Sonuçta çocukların atopik olmalarının CD14 C159T polimorfizmiyle ilişkili olmadığını göstermişlerdir. CC genotipli çocuklarda, artmış endotoksin dozunun sensitizasyon riskinde ve egzemada azalmayla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, CC genotipinde artan endotoksin teması ile nonatopik vizingin arttığı da gözlenmiştir (Simpson ve ark., 2006).

Keoki-Williams ve arkadaşlarının bir yenidoğan kohortunun ebebeynlerini incelediği çalışmasında CD14 C159T polimorfizminin total IgE seviyeleri ile ilişkisinin olmadığını bulmuşlar fakat ev tozu endotoksini teması gözönüne alındığında, yüksek ev tozu endotoksini ile temasın CC genotiplilerde daha düşük total IgE seviyelerine yol açtığı gösterilmiştir (Keoki-Williams ve ark., 2006).

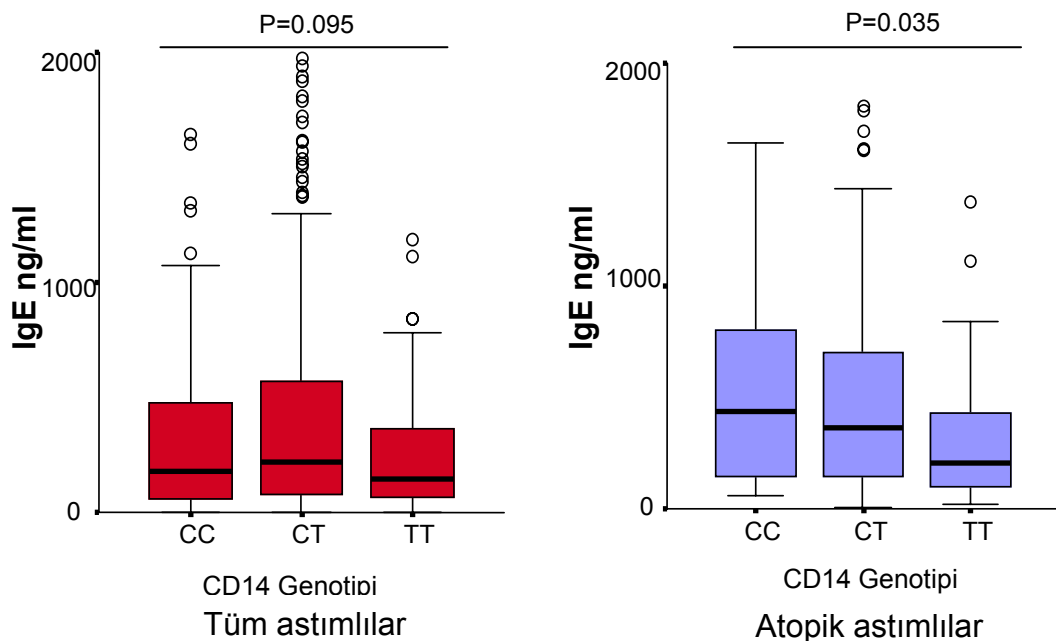
Bu çalışmaların hepsi toplum bazlıdır, astımlıları temsil etmez. Zambelli-Weiner ve arkadaşlarının astım hastaları ve ailelerini dahil ettiği araştırmada tüm katılımcıların CD14 C159T polimorfizmlerine bakılmıştır ve ev tozu örneklerinde endotoksin miktarı ölçülmüştür. CD14 TT genotipinin sağlıklılarda astımlılara göre 2 kat fazla olduğu gözlenmiştir (11.2% ve 6.1%, sırasıyla). Düşük doz endotoksine maruz kalan bireylerde CD14 TT genotipi astımdan koruyucu bulunmuştur. Fakat yüksek derecede endotoksinle temas edenlerde TT genotiplilerde astım riskinin, CC genotiplilere göre yaklaşık 11 kat arttığı gösterilmiştir (Zambelli-Weiner ve ark., 2005).

Özet olarak bu çalışmalar ortak olarak C allelinin düşük endotoksin karşılaşmalarında, T allelinin ise yüksek endotoksin karşılaşmalarında bir risk olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, CD14 C159T polimorfizmi ile astım ve atopi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda elde edilen çelişkili sonuçları da kısmen açıklayabilir.

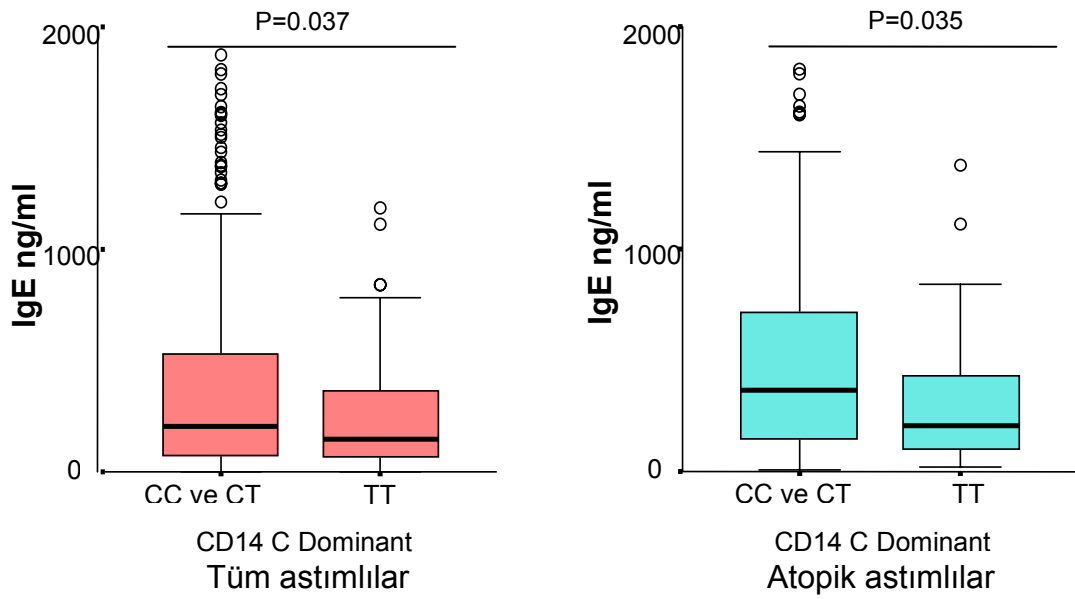
2.6.6.Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizminin astım fenotipleri üzerine etkisi

Yukarıda da belirtildiği gibi CD14 -159 polimorfizmi ve serum total IgE miktarları ve astım arasındaki ilişkiye dair yapılan araştırmalarda toplumlar arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Biz de Türk toplumunda CD14 -159 C/T polimorfizmi ve astım arasındaki ilişkiyi belirlemek için Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi'nde izlenen 613 astımlı çocuğu bu polimorfizm açısından inceledik. Çocuklara astım tanısı aralıklı vizing hikayesi, bronkodilatör uygulamasını takiben FEV1'de %12 iyileşme ile tanımlanan geri dönüşümlü havayolu obstrüksiyonu, anti-astım tedaviye

yanıt veya metakolin provokasyon testinde anormal bulgu ($PC_{20} < 8 \text{ mg/dl}$) ile konuldu. CD14 C159T genotipi, polimeraz zincir reaksiyonu-RFLP (parça uzunluğu değişkenliği analizi) yöntemi ile belirlendi. Atopik astımlı çocuklarda serum total IgE seviyesi kodominant model kullanıldığında her üç genotip arasında (CC, CT, TT) IgE düzeylerinde anlamlı farklı sonuçlar bulundu ($p=0.035$) (Şekil 2. 6). C baskın (*dominant*) model kullanıldığında ise CD14 C159T genotipi düşük IgE seviyesi ile ilişkili bulundu ($p=0.015$) (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. Astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizmine göre serum total IgE düzeyleri



Şekil 2.7. Astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T polimorfizmi, C baskın (*dominant*) modele göre serum total IgE düzeyleri.

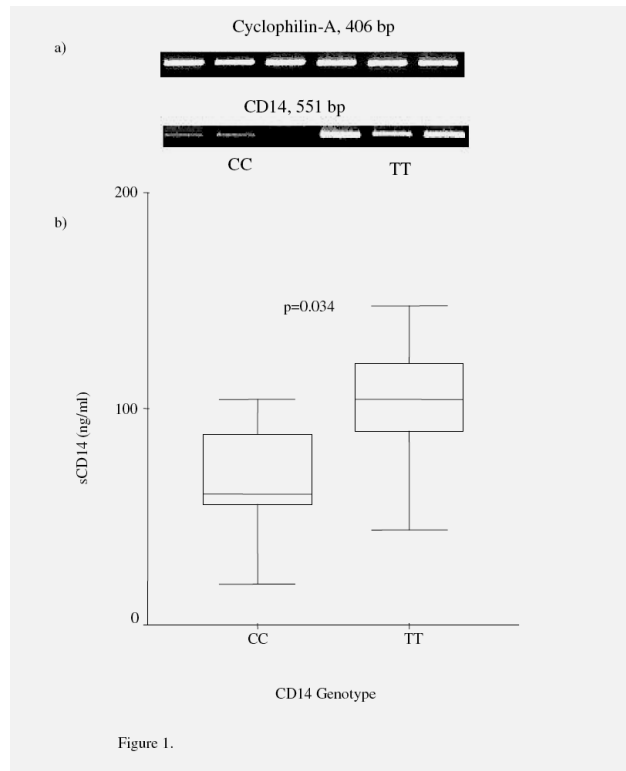
Total IgE düzeylerine etki eden faktörleri saptamak için yaptığımız lojistik regresyon çoklu değişken analizinde astımlı çocuklarda periferik kanda eozinofil sayısı ve deri testlerinde pozitif yanıt ile yüksek IgE düzeyleri ve CD14 -159 TT genotipi ile düşük IgE seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulduk (OR 0.503; %95 GA 0.28-0.9; $p=0.021$).

İlk çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular CD14 C159T polimorfizminin IgE ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Sackesen ve ark., 2005)

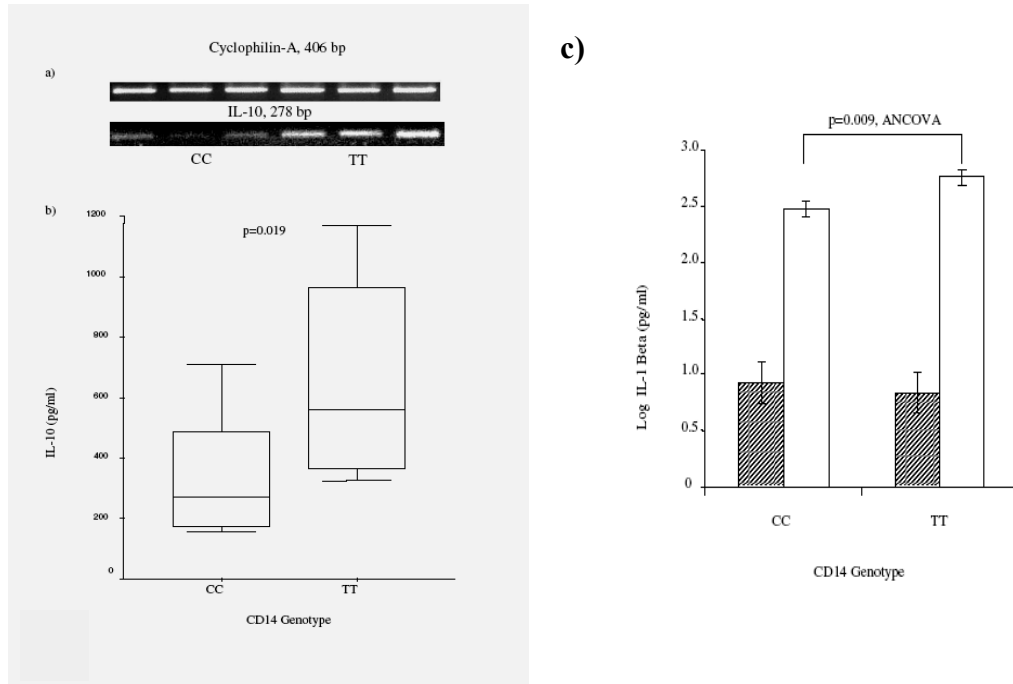
2.6.7. Astımlı çocuklarda CD14 C159T polimorfizminin, endotoksin ile uyarılan periferik kan mononükleer hücrelerinin sitokin yanıtı üzerine etkisi

Anılan çalışmalar IgE ve endotoksin arasında bir ilişkinin varlığını ortaya koymakla beraber, bu ilişkinin hücresel ve moleküler mekanizması halen bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmalarımızın ikinci aşamasında farklı genotiplere sahip astımlı bireylerden elde ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMH) LPS'e yanıt olarak sitokin profillerindeki değişimini inceledik. TT genotipine sahip 11 ve CC genotipine sahip 11

astımlı cocuktan elde edilen PBMC örnekleri 100ng/ml LPS ile veya sadece hücre kültürü vasatı ile 48 saat süre inkübe edildi. Bu süre sonunda hücre süpernatantlarında sCD14, IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β ve IFN- γ seviyeleri ELISA ile ve transkripsiyonel değişiklikler ise ters transkriptaz yöntemi ile belirlendi. TT genotipine sahip bireylerde ortamda stimulan olmaksızın sCD14 seviyesinin CC genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu ($p=0.03$, Mann Whitney U), endotoksin ile uyarıdan sonra bu farkın ortadan kalktığı gösterildi ($p>0.05$, ANCOVA) (Şekil 2.8). LPS uyarısından sonra ise IL-10 ve IL-1 β seviyelerinin TT genotipine sahip bireylerde CC genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu ($p=0.02$ ve $p=0.009$, ANCOVA) bulundu (Şekil 2.9). Genotipler arasındaki bu farklılıklar IL-12, IL-13, TGF- β ve interferon (IFN)- γ için saptanmadı (Keskin ve ark., 2006).



Şekil 2.8. CD14 C159T polimorfizmine göre uyarılmamış periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde a) CD14 mRNA ekspresyonu b) sCD14 seviyeleri



Şekil 2.9. CD14 C159T polimorfizmine göre uyarılmamış periferel kan mononükleer hücre kültürlerinde a) IL-10 mRNA ekspresyonu b) IL-10 seviyeleri c) LPS uyarısı öncesi ve sonrası IL1β seviyeleri (Koyu kolon LPS uyarısı öncesi, açık renk kolon LPS uyarısı sonrası IL1β seviyelerini göstermektedir.)

İnterlökin-10'un, sağlıklı nonatopik kişilerin PKMH kültürlerinde IL-4'ün uyardığı IgE sentezini inhibe ettiği bulunmuştur (Punnonen ve ark., 1993). Ayrıca Akdiş ve arkadaşları, spesifik immünoterapi ile artan IL-10 yapımının periferel T hücrelerinde spesifik anerjiye neden olduğunu ve IgE yanıtını azalttığını göstermişlerdir (Akdiş ve ark., 1998). Bu durum T alleleline sahip kişilerin PKMH'lerinin endotoksin ile uyarı sonrası daha fazla IL-10 üretmesini ve periferel kanda daha düşük IgE düzeylerini açıklayabilir.

Gram negatif enfeksiyonlarda, bakterinin dış membranından endotoksin salınımı IL-1β gibi endotoksik şoktan da sorumlu olabilen proinflamatuvar mediatörleri uyarır (Dinarello, 1998; Heumann ve ark., 1998). Bazı çalışmalarda CD14 C159T genotipinin endotoksik şoklu hastalarda kontrollere göre daha sık görüldüğü gösterilmiştir (Gibot ve ark., 2002). CD14 promotor polimorfizmi ile daha şiddetli sepsis arasındaki

ilişkinin nedeni CD14 C159T genotipli hastaların endotoksin ile uyarıldıktan sonra IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri daha fazla üretmeleri olabilir.

Bu çalışmamız, endotoksin – IgE bağlantısında IL-10'un önemli bir rol oynadığını ortaya koymakla beraber halen bu ilişkinin mekanizması aydınlığa kavuşmamıştır. Ayrıca epidemiyolojik gözlemler bu ilişkiyi desteklemekle beraber gerçekte farklı genotipe ait bireylerden elde edilen hücrelerin gerçekten de farklı miktarlarda IgE sentezleyip sentezlemedikleri bilinmemektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hastaların belirlenmesi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi'nde izlenen 6-18 yaşında astımlı hastalar çalışmaya dahil edildi. Çocuklara astım tanısı, aralıklı vizing hikayesi, bronkodilatör uygulamasını takiben FEV1'de %12 iyileşme ile tanımlanan geri dönüşümlü havayolu obstrüksiyonu, veya metakolin provokasyon testinde anormal bulgu (PC20 < 8 mg/dl) ile konuldu.

Hastaların atopilerini saptamak için 30 aero-allergen ve 8 besin allergeninden oluşan 38 allergenle deri testi yapıldı. Pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı. Negatif kontrole göre 3 mm'den daha büyük endürasyon çapı pozitif olarak değerlendirildi. Deri testlerinden en az bir tanesi pozitif olan çocuklar atopik kabul edildi.

3.1.1 Hastaların genotiplerinin saptanması

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi'nde izlenen ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan periferik kandan standart fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile CD14 C159T gen lokusu için genotiplendirme yapıldı.

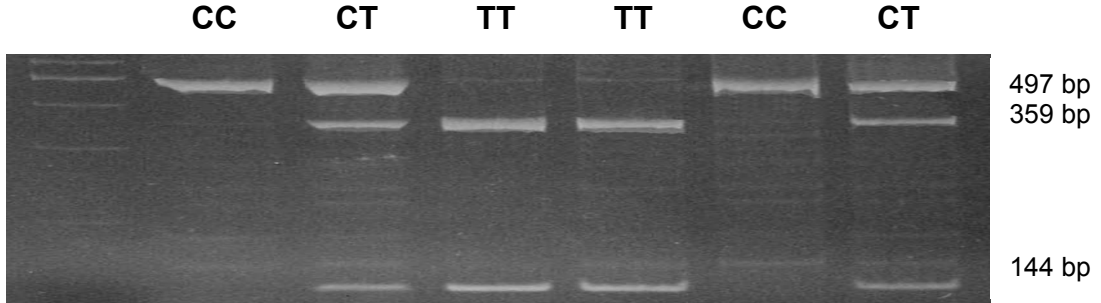
Kullanılan primer dizileri:

Forward primer: 5'-GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC-3'

Reverse primer: 3'-GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-5'

Polimeraz zincir reaksiyonu karışımına, her bir reaksiyon için toplam 25 µl olacak şekilde, primer çiftlerinden 10 µl, 1.5 mM MgCl₂, 1 µl dNTP, 3 IU Taq polimeraz (Promega) ve hastanın DNA'sından 2 µl konuldu. Denaturasyon 94 °C da 30 saniye, primer eşleşmesi 60 °C de 30 saniye, zincir uzaması 72 °C de 45 saniye olmak üzere üç basamaklı PCR programı 35 kez tekrarlandı. Elde edilen 497 baz çiftlik ürün 5 U *AvaII* enzimi ile kesildi ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviole ışığında incelendi. T alleli varlığında *AvaII* enzimi kesim yapabildi ve 144 ile 353 baz çiftlik

amplifikasyon ürünü elde edildi. C alleli varlığında ise enzim kesim yapamadı ve 497 baz çiftlik kesilmemiş ürün agaroz jelde görüldü (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 CD14 C159T genotiplemesi

3.1.2. Çalışma grubu

CD14 C159T gen lokusu için genotiplendirilen hastalardan aşağıdaki kriterlere sahip hastalar tekrar değerlendirilmek üzere çağırıldı.

Dahil edilme kriterleri

- 6-18 yaş arasında olmak
- CD14 C159T'de CC veya TT genotipine sahip olmak
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olmak ve yazılı izin vermek

Hariç tutulma kriterleri

- Son 4 hafta içinde astım alevlenmesi
- Son 4 haftada üst veya alt solunum yolu enfeksiyonu geçirme
- Son 4 haftada oral kortikosteroid almak
- Astım dışında sistemik hastalık varlığı

Hastalar hikayeleri, fizik muayeneleri ve solunum fonksiyon testleri (2130 Spirometer, Sensor Medics Co, CA, ABD) ile tekrar değerlendirildi. Son 2 yılda deri testleri yapılmamışsa tekrarlandı. Total IgE düzeyleri Uni-Cap sistemi (Pharmacia, Kalamazoo, MI) ile ölçüldü. Eozinofil sayısı Coulter Counter lökosit ölçümü ile belirlendi.

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: TBK 08/4-8). Tüm aileler çalışma ile ilgili bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş onam formu alındı.

3.2. Hücre kültürlerinin yapılması

Çalışmaya dahil edilen hastalardan 20 cc periferik kan örneği heparinli enjektöre alındı.

3.2.1 Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

- 1- Heparinli enjektörlere alınan periferik kan örnekleri eşit oranda PBS (Phosphate Buffered Saline) ile karıştırıldıktan sonra Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) solüsyonu üzerine tabaka oluşturacak şekilde yayıldı.
- 2- Daha sonra 2000 rpm'de 30 dakika frenler kapalı olarak santrifüj edildi.
- 3- Gradient santrifügasyon ile serum tabakasının altında bulutumsu bir tabaka olarak ayrılan PKMH'ler toplanarak temiz bir 50 ml falkon tüpe alındı.
- 4- Üzerine 30 ml PBS ilave edilerek 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Böylece ficoll (Histopaque 1077) uzaklaştırıldı.
- 5- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet tekrar 30 ml PBS ile yıkandı.
- 6- 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra 10 ml PBS ile sulandırıldı ve hücre sayımı yapıldı.
- 7- Hücreler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1×10^6 /ml olacak şekilde uygun medya içinde sulandırıldı.

3.2.2 IMDM Besiyerinin Hazırlanması ve Hücre Kültürü

%10 FBS (Fetal Bovin Serum, Hyclone), %0.5 BSA (Bovine Serum Albumin, Fluka, BioChemika, Germany), 36mM sodyum bikarbonat, %1 ITS+Premix (12.5 mg Rekombinant İnsan İnsulini, 12.5 mg Transferrin, 12.5 mg Selenöz asid ve 10.7 mg linoleik asid, BD Biosciences, MA, USA), Penisilin (100u/ml) ve Streptomisin (100mg/ml) ile IMDM (Iscove's

Modified Dulbecco's Medium +L-Glutamin, Gibco, Grand Island, N.Y, USA) besiyeri hazırlandı.

IMDM besiyerinde her kuyucukta 1×10^6 hücre 37°C , %5 CO_2 'de IgE için 12 gün süreyle inkübe edildi. Her hastadan tüm hücre kültür koşulları çiftler yapıldı. Böylece 5.günde IgE ekspresyonu için hücreler, 12.günde ise IgE ölçümü için supernatant toplandı. İnkübasyon sonunda 12.günde toplanan süpernatantlardan IgE düzeyi ölçüldü. Beşinci gün hücre kültürleri toplandı, sentrifüj edildi ve hücre pelletlerinde IgE ekspresyonunu saptamak için mRNA izole edildi.

3.2.3 Hücre Kültür Koşulları

Periferik kan mononükleer hücreleri farklı konsantrasyonlarda LPS (2 ve 200 ng/ml), IL-4 (25 ng/ml), IL-2 (40 ng/ml) ve CD40L (%20 oranında, 200 $\mu\text{l/ml}$) ile uyarıldı. Aşağıda hücre uyarılma koşulları ayrıntılı şekilde görülmektedir.

- 1- Uyarılmamış hücre
- 2- IL4
- 3- IL4+IL2
- 4- CD40 ligand
- 5- IL4+IL2+CD40 ligand
- 6- LPS 2ng/ml
- 7- LPS 200ng/ml

3.3 Hücre kültürü süpernatantlarında IgE ölçümü

Hücre kültürü süpernatantlarından IgE ölçümü için laboratuvarımızda Dr. Esra Birben tarafında geliştirilen sandviç ELİSA yöntemi kullanıldı çünkü total IgE'nin serum örneklerinden ölçülebilmesi için birçok farklı yöntem ve ticari olarak satılan birçok kit bulunmasına rağmen hücre kültür örneklerinde total IgE'nin ölçülebilmesi için geliştirilmiş olan ticari olarak satılan bir kit bulunmamaktadır. Hücre kültür örneklerinde total IgE miktarı kullanılan uyarana bağlı olarak değişmekle beraber serum örneklerinde ölçülen değerlerle kıyaslandığında oldukça düşüktür.

Laboratuvarımızda hücre kültür süpernatantlarında total IgE miktarını ölçebilmek için aşağıda ayrıntıları belirtildiği şekilde miktarı belirlenmek istenen antijenin antijeni farklı kısımlarından tanıyıp bağlayan iki farklı özgül antikor arasında hapsedilmesi esasına dayanan ve ismini bu özelliğinden alan sandviç Elisa yöntemi geliştirilmiştir.

İlk olarak plağı kaplamak için kullanılan poliklonal özgül antikor (*coating antibody, Polyclonal Rabbit antihuman IgE antibody*, Dako Cytomation, Denmark) ve belirleyici olarak kullanılan monoklonal özgül antikorun (*detecting antibody, HRP conjugated Goat antihuman IgE*, Biosource, CA, ABD) optimal konsantrasyonların belirlenmesi için “*checker board*” analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için içerdiği total IgE miktarı bilinen bir örnek (32 ng/ml) ve standartın (N Protein Standart SL, Dada Behring) bilinen 4 farklı konsantrasyonu (64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml) iki antikorun farklı konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlar kullanılarak sandviç elisa ile ölçülmüştür.

- 1- Her kuyucuğa aşağıda belirlenen konsantrasyonlarda PBS içerisinde dilüe edilmiş olan kaplama antikorundan 100 µl konuldu ve plak 4’de gece boyu bekletildi.

Tablo 3.1. Kaplayıcı antikor ve belirleyici antikor konsantrasyonları

	Kaplayıcı antikorun konsantrasyonu (µg/ml)					
Belirleyici antikorun konsantrasyonu	2.5	5	7.5	10	12.5	15
1/1000						
1/2000						
1/4000						
1/8000						

- 2- Plak boşaltıldıktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl %3 fetal sığır serumu (FBS) ve %3 sığır serum albümini (BSA) içeren PBS (bloklama solüsyonu) ilave edildi.

(Değişik konsantrasyonda BSA ve FBS denendikten sonra yukarıdaki konsantrasyona karar verilmiştir.)

- 3- 2 saat oda ısısında bekletilen plak boşaltıldı ve %0.1 Tween 20 içeren PBS ile her bir kuyucuğa 200 µl ilave etmek sureti ile 3 kez yıkandı.
- 4- Bloklama solusyonu içinde dilüe edilen standart örneklerinden (64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml) ve bilinen konsantrasyondaki örnekten (32 ng/ml) belirlenen kuyucuklara 100 µl ilave edildi.
- 5- Oda ısısında 2 saat bekletilen plak yukarıda belirtildiği şekilde üç kez yıkandıktan sonra yukarıda belirtilen değişik miktarlardaki belirleyici antikordan belirlenen kuyucuklara 200 µl ilave edildi.
- 6- Plak oda ısısında 2 saat inkübe edildikten sonra 3 kez yıkandı ve 100 µl substrat solusyonu (TMB) ilave edildi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
- 7- İnkübasyon sonunda 100 µl %10'luk H₂SO₄ ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

Yapılan deney sonucunda kaplayıcı antikor için optimum konsantrasyon olarak olarak 12.5 ve 15 µg/ml arasında pek fark olmadığı belirleyici antikor konsantrasyonu olarak 1/4000 ve 1/8000 arasında da yine pek fazla bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Optimal antikor konsantrasyonları belirlendikten sonra, yöntemin hassaslığını belirleyebilmek için yüksek konsantrasyonda total IgE içerdiği bilinen birkaç örnek ½ seri dilüsyonla sulandırılarak örnekler yukarıda belirlenen şekilde sandviç elisa ile ölçülmüştür.

Optimal inkübasyon sürelerinin belirlenmesi için alternatif olarak örnekler optimal antikor konsantrasyonlarında belirleyici antikorla 4°C'de gece boyu inkübe edildi yine alternatif olarak, stop solüsyon ile durdurulmadan önce örnekler substrat solüsyonu ile 15, 30 dakika ve 1 saat süre ile inkübe edildi.

Son olarak kaplayıcı antikor konsantrasyonu olarak 14 µg/ml ve belirleyici antikor konsantrasyonu olarak 1/6000 konsantrasyonlarının

kullanılmasına, inkübasyon süreleri olarak belirleyici antikorla oda ısısında 2 saat inkübasyonun, substrat solüsyonu ile 30 dakika inkübasyonun yeterli olduğuna karar verilmiştir.

Belirlenen koşulların hücre kültür süpernatantlarında ölçüm için uygun olup olmadığının ve standart aralığının belirlenebilmesi için IgE sentezini uyardığı bilinen IL4'ün farklı konsantrasyonları CD40 ligand ile uyarılmış hücre kültür süpernatantları kullanılarak ve yine pozitif kontrol olarak yüksek ve düşük standartlara yakın total IgE miktarı olan serum örnekleri kullanılarak deney optimum koşullarda tekrar edilmiştir.

Diğer belirlenen koşullar sabit olmakla beraber hücre kültür süpernatantlarında IgE miktarlarının düşük olması nedeni ile substrat solüsyonu ile 30 dakika inkübasyonun yeterli olmadığına 1 saat inkübe edilmesine karar verilmiştir.

Sonuçta, hücre kültürü süpernatantlarında IgE ölçümü yöntemini özetleyecek olursak;

İlk olarak PBS içinde uygun konsantrasyonda hazırlanan anti-IgE (Polyclonal rabbit anti-human IgE antikor, DakoCytomation, Denmark), anti-human IgA1/2 (BD Pharmingen, BD Biosciences, MA, USA), anti-human IgG1 (BD Pharmingen, BD Biosciences, MA, USA) antikorları ile plaklar 4°C'de 16 saat kaplandı. Plaklar Tween 20 içeren PBS ile yıkandıktan sonra standartlar ve örnekler ilave edildi ve oda ısısında IgE için 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında plaklar yıkandı ve uygun konsantrasyonda HRP işaretli goat anti-human IgE antikor (Biosource, CA, USA), biyotin işaretli anti-human IgA1/2 (BD Pharmingen) ve biyotin işaretli anti-human IgG1 (BD Pharmingen) ile inkübe edildi. Plaklar yıkandıktan sonra enzimin substratı ilave edilerek renk oluşumu sağlandı. Oluşan renk 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda değerlendirildi.

3.4. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için QIAGEN firmasının RNAeasy isimli RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Qiagen, CA, USA).

1- Hücre pelletleri, kullanılmadan önce içine % 1 β -Merkaptoetanol ilave edilmiş 350 μ l RLT tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalandı.

2-Üzerine eşit miktarda steril DEPC su ile sulandırılmış %70 etanol ilave edildi ve 2 ml'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan kolon üzerine pipetlendi.

3-Tüpler 13000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi.

4-Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine 700 μ l RWL yıkama tamponu ilave edildi.

5-Tüpler 13000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi.

6-Kolon yeni bir toplama tüpü üzerine yerleştirildi ve kolona 500 μ l RPE solüsyonu ilave edildi ve 13000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.

7-Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine yine 500 μ l RPE solüsyonu ilave edildi.

8-Tüpler 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

9-Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine hiçbir şey ilave edilmeden yine 13000 rpm'de 1dakika santrifüj edildi.

7-Kolon steril 1.5 ml ependorf tüp üzerine alındı ve üzerine 50 μ l RNaz içermeyen su ilave edilerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C de saklandı.

3.5. Komplementer DNA (cDNA) eldesi

RNA örneği (500-1000ng) Speed Vac yardımı ile kurutulduktan sonra ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürüldü.

Kurutulan RNA örneklerinin üzerine 1 μ l mRNA'ların poly A kuyruğuna eşlenik olan oligo dT ve 4 μ l nükleaz içermeyen su ilave edildi. Tüpler 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek katlanmış olan RNA zincirlerinin açılması ve oligo dT nin zincirdeki eşleniği olan bölgeye ulaşması sağlandı.

İnkübasyon sonunda örnekler önce 5 dakika buzlu suda daha sonrada buzda bekletilerek primerin (oligo dT) kalıba yapışması sağlandı. Sonra aşağıda belirtildiği şekilde bir karışım hazırlandıktan sonra tüpler önce 25°C'de 5 dakika ve daha sonra 42°C'de 1 saat inkübe edilerek komplementer DNA'ların oluşumu sağlandı. Reaksiyon sonunda Reverse Transkriptaz enziminin denature edilebilmesi için tüpler 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

5µl	Primer ve RNA karışımı
4µl	5XReaksiyon tamponu
1µl	dNTP karışımı
1.5µl	MgCl ₂
0.5µl	RNAaz inhibitörü
1µl	Reverse Transkriptaz enzimi
7µl	Nükleaz içermeyen su
20µl	<u>Toplam reaksiyon karışımı</u>

3.6. *Real Time* Polimeraz zincir reaksiyonu

Real Time PCR, TaqMan RT kimyasalları (Applied Biosystems) kullanılarak yapıldı ve ABI PRISM 7000 Sekans deteksiyon sisteminde reaksiyon gerçekleştirildi (Applied Biosystems). *House keeping gene* olarak Elongasyon faktörü kullanılarak relatif ekspresyon hesaplandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu için primerler ve probler dizayn edilirken GenBank/EMBL/DDBJ'daki sekanslar kullanıldı.

Primer dizileri

EF-1 α f, 5'-CTGAACCATCCAGGCCAAAT-3'

EF-1 α r, 5'-GCCGTGTGGCAATCCAAT-3'

IgE f, 5'ACACATCCACAGGCACCAAA-3'

IgE r, 5'TTGCAGCAGCGGGTCAA-3'

Primer master karışımı, 20 µl *forward* primer, 20 µl *reverse* primer ve 460 µl su eklenerek hazırlandı. İlk olarak cDNA'lar 15 kat sulandırıldı. Aşağıda belirtilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

7.35µl	SYBR green karışımı
2.35µl	Primer master karışımı
5µl	cDNA
<u>14.7µl</u>	<u>Toplam reaksiyon karışımı</u>

Denaturasyon 95°C'de 2 dakika başlangıçta yapıldı. 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 45 saniyeden oluşan 2 basamaklı PCR programı 40 kez tekrarlandı. Tüm örnekler 3 kopyalı (triplikat) çalışıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi için "SPSS for Windows 15" programı kullanıldı. İlk olarak verilerin normal dağılıp dağılmadığı incelendi, normal dağılıma uymayan verilerin analizinde nonparametrik yöntemler kullanıldı. Normal dağılmayan veriler "Mann-Whitney U Testi" ile karşılaştırıldı. Çoklu kıyaslamalarda Bonferoni yöntemine göre anlamlı p değeri belirlendi. Demografik özelliklerin karşılaştırılmasında "Ki-kare" istatistiği yapıldı. Hücre kültürü koşullarındaki farklılıklara göre süpernatantlardaki IgE değişiklikleri genotipler arasında "Mann-Whitney U Testi" ile, aynı genotip içinde ikili karşılaştırmalar "Wilcoxon testi", üçlü karşılaştırmalar "Friedman testi" ile analiz edildi. Normal dağılım elde etmek için IgE mRNA ekspresyon değerlerine 1 eklenip logaritmik transformasyon yapıldı.

BULGULAR

4.1 Genel özellikler

Çalışma Mart 2007-Mart 2008 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Çocuk Allerji ve Astım Kliniği'nde yapıldı. Daha önceden CD14 C159T promotor bölgesinde polimorfizmleri belirlenmiş, 22 CC ve 23 TT genotipli toplam 45 astımlı hasta araştırmaya dahil edildi. Hastaların genotiplerine göre demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları tablo 4.1'de özetlendi.

Tablo 4.1 Hastaların CD14 C159T polimorfizmine göre demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

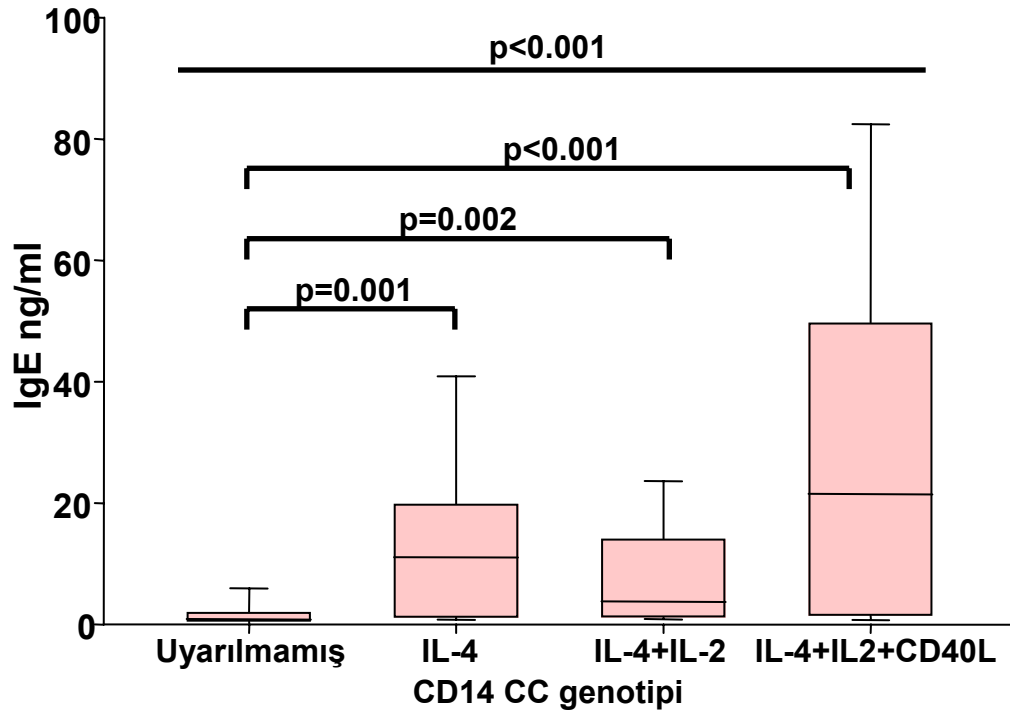
Değişken	CC (n=22)	TT (n=23)	P
Erkek cinsiyet (%)	11 (50)	13 (56.5)	>0.05†
Yaş*	11.2 (10.2-11.6)	10.5 (9.5-11.6)	>0.05‡
Astım Başlangıç yaşı*	6 (4-10)	4 (2.5-7)	>0.05 ‡
Atopik dermatit	1	0	>0.05†
Allerjik rinit	11	9	>0.05†
Aile hikayesi	7	7	>0.05†
Sigara maruziyeti	5	5	>0.05†
Evde hayvan besleme	2	3	>0.05†
Atopi	11	11	>0.05†
IgE*	110 (50-309)	109 (65-230)	>0.05‡
Eozinofil %*	3.3 (2.27-4.9)	2.9 (1.9-4.5)	>0.05‡
Eozinofil sayısı*	292 (187-399)	186 (129-335)	<0.05‡
FEV1 (%)*	95.5 (88.8-106.3)	100 (90-108)	>0.05‡

*ortanca (çeyrekler arası aralık)

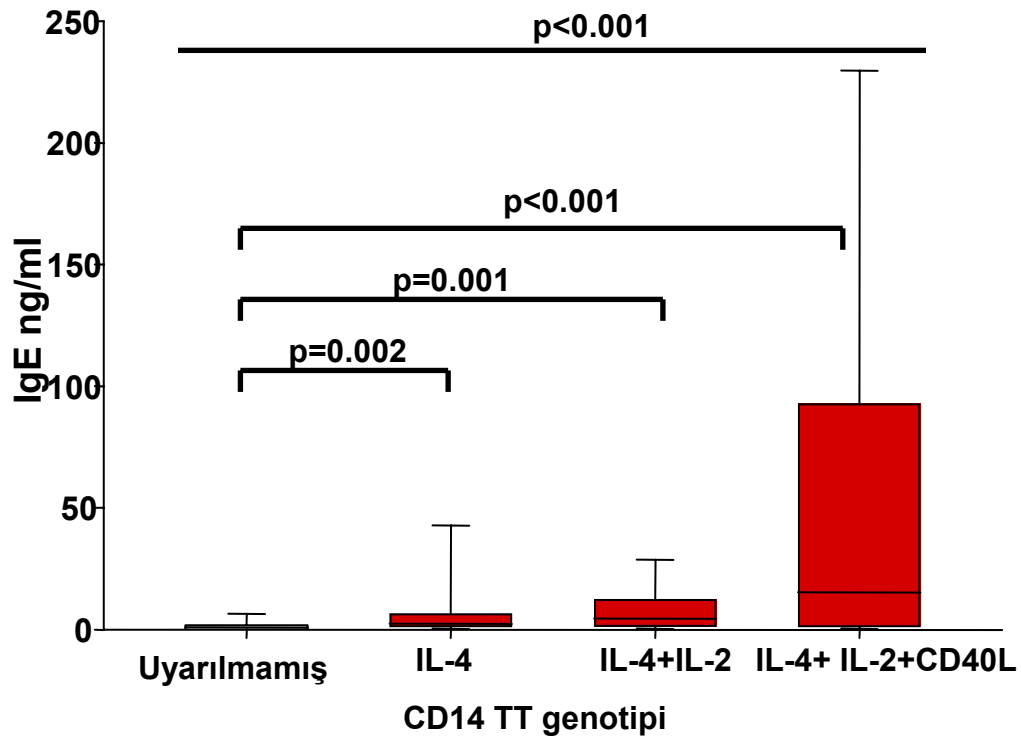
†Ki-kare istatistiği, ‡Mann-Whitney U-testi

4.2.1 IL-2, IL-4 ve CD40L ile stimulasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri

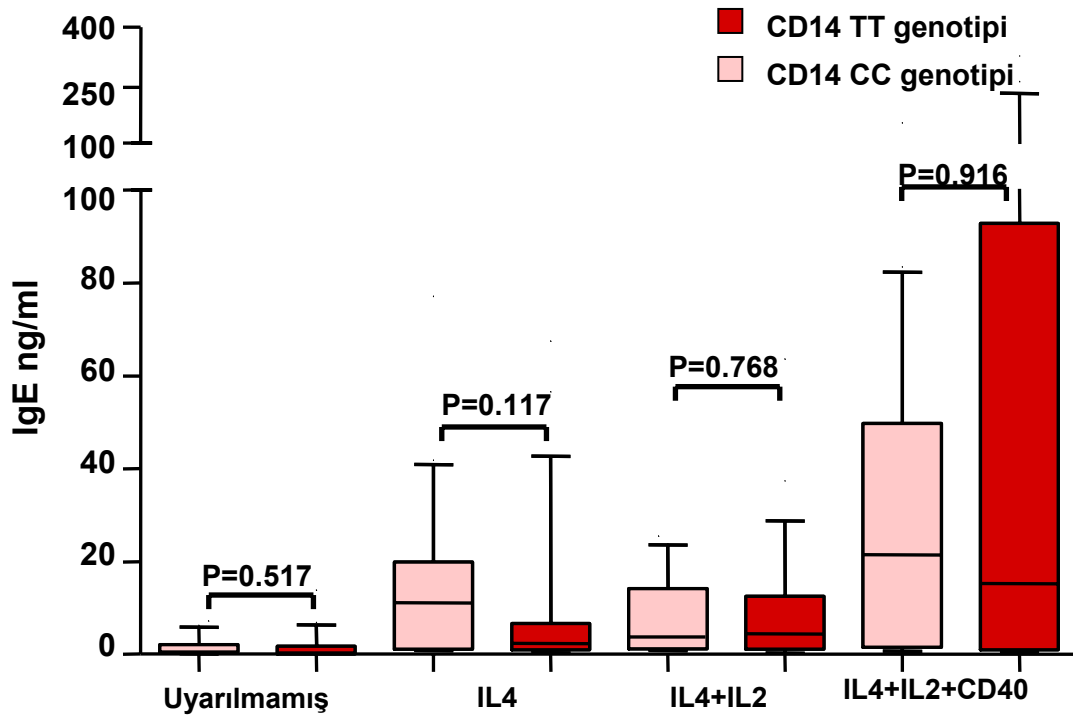
CD14 -159 CC ve TT genotipindeki astımlı çocuklardan izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin IL-2, IL-4 ve CD40L ile stimulasyonu her koşulda, stimulasyon olmayan koşula göre artmış IgE sentezi ile sonuçlandı ve Bonferoni düzeltmesi ile istatistiksel anlam saptandı (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Mediatorlerin uyarısı sonucu oluşan koşullardan IL-4+IL-2 ve IL-4+IL-2+CD40L arasında fark bulundu ($p<0.05$). Koşullar genotiplere göre birebir karşılaştırıldığında fark gösterilemedi (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. CD14 C159T polimorfizmi, CC genotipi; IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri.



Şekil 4.2. CD14 C159T polimorfizmi, TT genotipi; IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri.

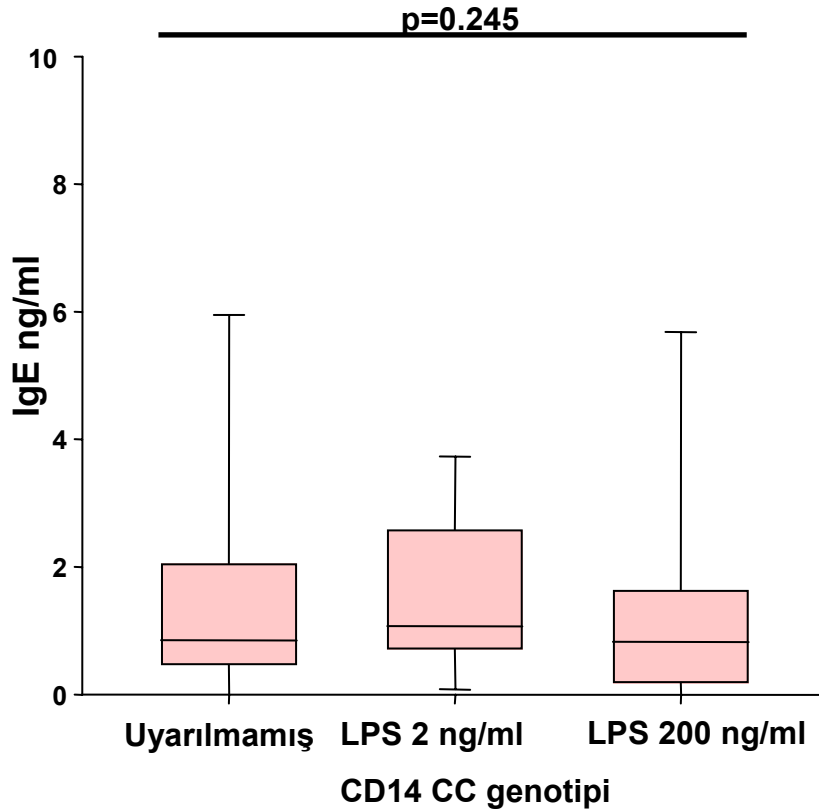


Şekil 4.3. IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması

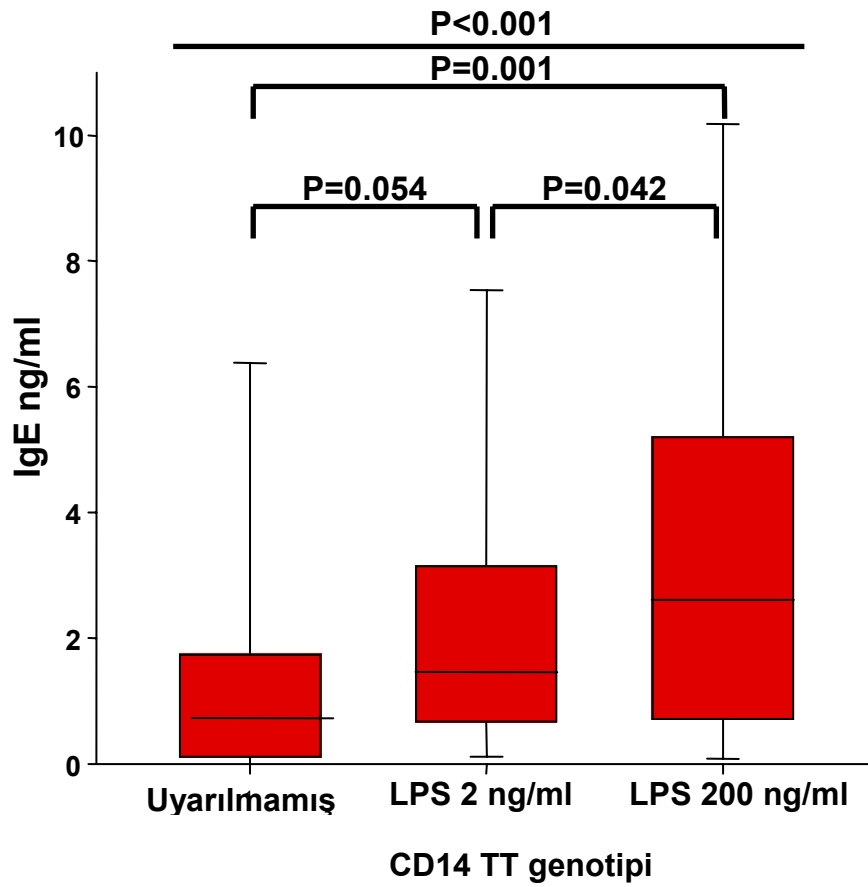
Hastalar atopi durumlarına göre tekrar gruplandırıldığında nonatopik çocuklarda sadece IL-4 uyarısı sonrası CC genotipinde TT genotipine göre IgE düzeylerinde daha fazla artış saptandı [sırasıyla 12.61 (3.53-19.04) ng/ml ve 2.32 (0.8-3.33) ng/ml, $p=0.012$]. Atopik hastalarda IL-2, IL-4 ve CD40L ile uyarıldığında hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri arasında genotiplere göre farklılık saptanmadı.

4.2.2 LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri

Astımlı çocuklardan izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası CD14 CC genotipinde artan LPS konsantrasyonları ile hücre kültürü süpernatantlarında artmış IgE konsantrasyonu saptanmazken CD14 TT genotipinde LPS 200 ng/ml ile uyarılmamış koşul arasında IgE düzeyinde anlamlı artış bulundu ($p=0.001$) (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

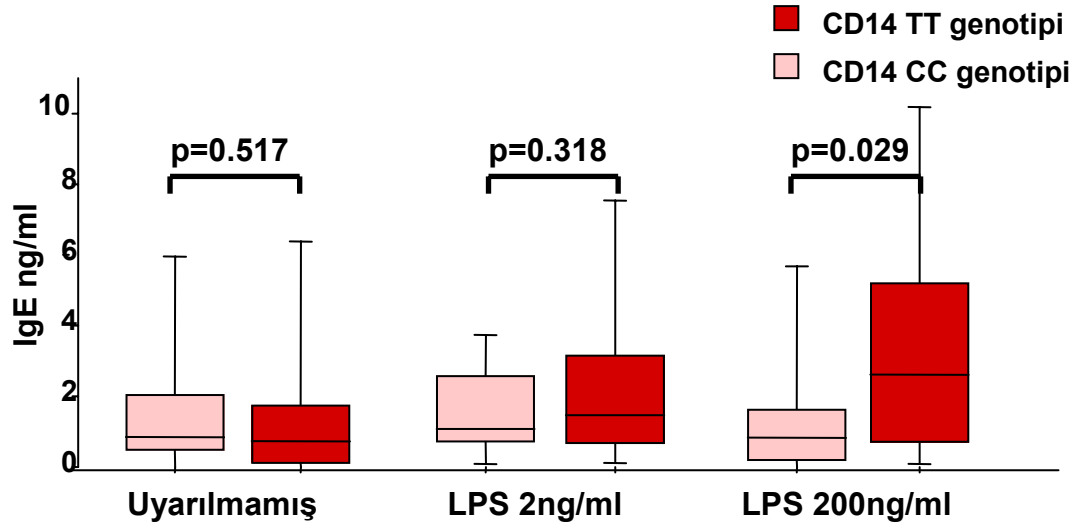


Şekil 4.4. CD14 C159T polimorfizmi, CC genotipi; LPS 2 ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri.

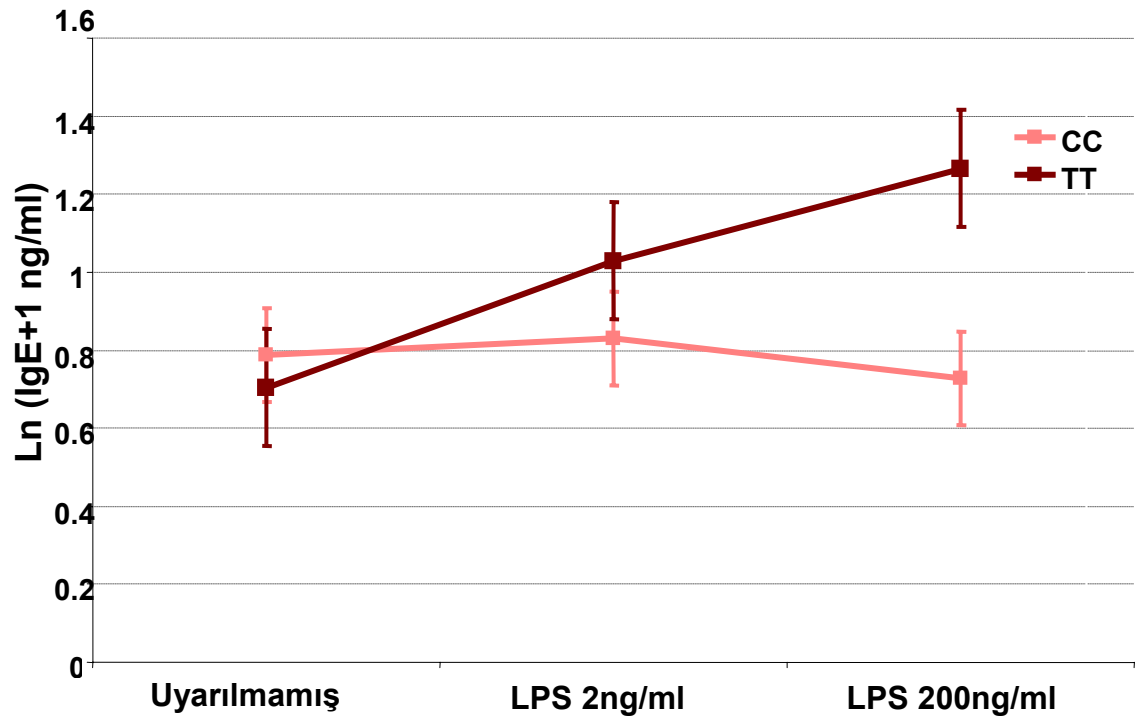


Şekil 4.5. CD14 C159T polimorfizmi, T aleli; LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri.

Periferik kan mononükleer hücrelerinin LPS 200 ng/ml konsantrasyonu ile uyarılmasından sonra hücre kültürü süpernatantlarındaki IgE düzeyleri CD14 -159, CC ve TT genotiplerinde farklılık gösterdi [sırasıyla 0.29 (0.18-1.64) ve 2.61 (0.7-5.21) ng/ml, $p=0.029$] (Şekil 4.6) (Şekil 4.7). Lipopolisakkarit uyarısı sonrası TT genotipinde hem atopik hem de nonatopik astımlı çocuklarda hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeyleri artmış bulundu.



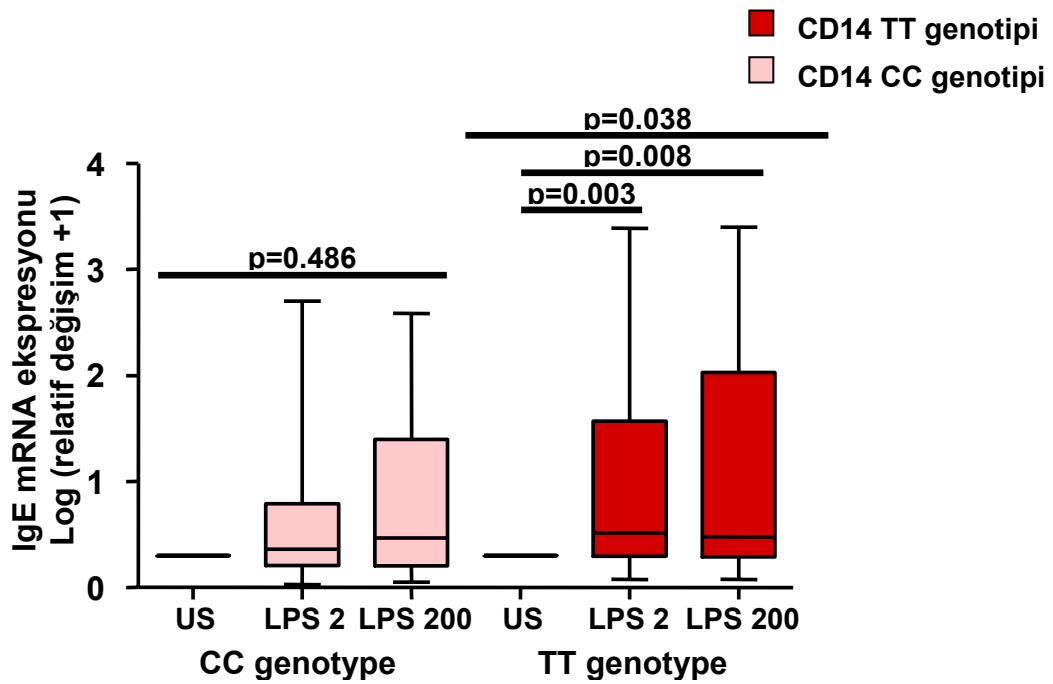
Şekil 4.6. LPS 2 ve 200 ng/ml ile stimülasyon sonrası hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması



Şekil 4.7. LPS 2 ng/ml ve 200 ng/ml ile uyarıldığında hücre kültürü süpernatantlarında IgE düzeylerinin genotipler arasında karşılaştırılması (verilere ln transformasyonu yapılmıştır.)

4.3 LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası hücre kültüründe “epsilon *germ line*” transkripsiyonu

Astımlı çocuklardan izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin LPS 2 ng/ml ve LPS 200 ng/ml ile uyarı sonrası 5. gün hücre kültüründe CD14 TT genotipinde artan LPS konsantrasyonları ile artmış IgE mRNA ekspresyonu bulundu, CD14 CC genotipinde ise artış gözlenmedi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. LPS 2 ng/ml ve 200 ng/ml ile uyarı sonrası 5. gün hücre kültürlerinde IgE mRNA ekspresyonları

TARTIŞMA

Son 20 yıldaki gelişmeler astım riskini etkileyebilecek birçok gen bölgesi ve bu bölgelere ait değişkenliklerin tanımlanmasını sağlamıştır. Ancak astım gibi kompleks hastalıkların etiyolojisinde birçok gendeki polimorfizm rol alabileceği için genetik çalışmalar oldukça zordur (Helman, 2007).

Allerjik duyarlılaşma ve astım tek gen hastalıklarından farklı olarak yalnızca genetik değişkenliklerin etkisiyle değil son derece karmaşık gen-çevre etkileşimleri sonucu ortaya çıkar. Bu konuda üzerinde en fazla çalışılan proteinlerden bir tanesi de LPS'in hücresel etkilerinin ortaya çıkmasını sağlayan CD14 molekülüdür. CD14, LPS'in hücreye bağlanması ve transferinden sorumludur (da Silva Correia ve ark., 2001). CD14 promotorundaki C159T polimorfizmi, transkripsiyon faktörlerinin affinitesini değiştirerek endotoksine hücresel yanıtı etkiler (LeVan ve ark., 2001).

İlerleyen çalışmalar endotoksine olan IgE yanıtını belirleyen faktörlerden birinin de -159 pozisyonundaki genotip olduğunu ortaya koymuştur. Birçok popülasyonda incelenen bu ilişkide farklı ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar TT genotipinin, bazı çalışmalar CC genotipinin yüksek IgE için risk olduğunu söylerken bazıları ise hiçbir ilişki olmadığını ortaya koymuştur.

Bu gözlem önceleri yalnızca popülasyonlar arası fark ile izah edilirken yakın zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalar bunun gen-çevre etkileşimi çerçevesinde esas olarak endotoksinin konsantrasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür (Eder ve ark., 2005; Zambelli-Weiner ve ark., 2005; Simpson ve ark., 2006; Williams ve ark., 2006)

Konuyla ilgili ilk çalışmamızda astımlı Türk çocuklarında CD14 C159T lokusunda TT genotipine sahip olmanın düşük serum IgE düzeyleri ile ilişkili olduğu ve ilişkinin atopik astımlılarda daha belirgin olduğunu; (Sackesen ve ark., 2005) mekanizmaya yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz bir diğer çalışmada ise TT genotipinde hücre kültürü süpernatantlarında IL-1 β düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptadık (Keskin ve ark., 2006). Şimdiki

çalışmamızı genotip ve IgE arasındaki ilişkinin moleküler ve hücresel mekanizmalarını araştırmak için gerçekleştirdik.

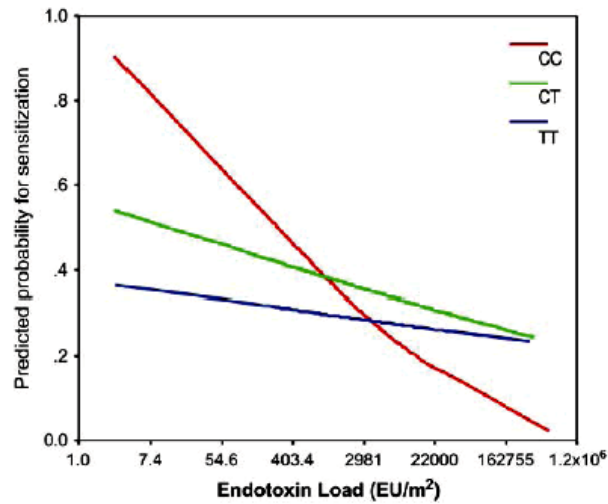
IgE sentezinde rol alan IL-4, IL-2 ve CD40L ile PKMH'leri uyardığımızda hücre kültürü süpernatantlarında beklendiği üzere IgE düzeylerinde belirgin artış saptandı. Hücre kültür ortamına IgE yapımını uyaran faktörler koyulduğunda saptanan yüksek IgE düzeyleri deney koşullarının verilerin analizi için gerekli optimum koşulları yerine getirdiğini gösteren önemli bir basamaktı. Hücre kültürü süpernatantlarındaki en yüksek IgE düzeyi beklendiği üzere, IL-4, IL-2 ve sCD40L'in birarada bulunduğu en güçlü uyaranlar eşliğinde belirlendi (Şekil 4.3).

Çalışmamızın en önemli bulgusu periferik kan mononükleer hücrelerinin 2 ng/ml ve 200 ng/ml konsantrasyonunda LPS ile uyarıldıktan sonra hücre kültürü süpernatantlarındaki IgE düzeylerinin CD14 C159T polimorfizminin T allelinde C allele göre daha yüksek bulunmasıdır. CD14 TT genotipinde, PKMH'lerinin LPS 200 ng/ml uyarılması sonrası IgE düzeyi 2.61 (0.7-5.21) ng/ml olarak saptanırken CD14 CC genotipinde 0.29 (0.18-1.64) ng/ml olarak ölçüldü ($p=0.029$). Yani T allelinde homozigot olan bireylerin hücreleri *in-vitro* koşullarda LPS uyarılmasına daha yüksek IgE sentezleyerek yanıt vermektedir. Daha da önemlisi, bu yanıt bir doz-cevap eğrisi şeklinde olup 2 ng/ml LPS dozu ile elde edilen IgE konsantrasyonu ile 200 ng/ml LPS dozu ile elde edilen IgE konsantrasyonları arasında da anlamlı bir fark vardır.

Çalışmanın 2. bölümünde *real time* PCR yöntemi ile elde edilen bulgular 12. gün süpernatantlarında IgE düzeylerinde görülen artışın esas olarak IgE'nin transkripsiyonundaki bir artıştan kaynaklandığını göstermektedir. Yani LPS TT genotipine sahip astımlı çocuklarda IgE sentezini transkripsiyonel düzeyde etkileyerek artırmaktadır

İki farklı çalışmada elde ettiğimiz sonuç ilk bakışta birbiriyle çelişkili gibi gözükmemektedir: Serumda total IgE düzeylerini incelediğimiz çalışmada CC genotipinde IgE düzeylerini artmış bulurken, şimdiki çalışmamızda TT genotipine sahip astımlı çocukların endotoksin stimülasyonuna yüksek IgE yanıtı verdiğini gözledik. Bu çelişki gen-çevre etkileşimi çerçevesinde

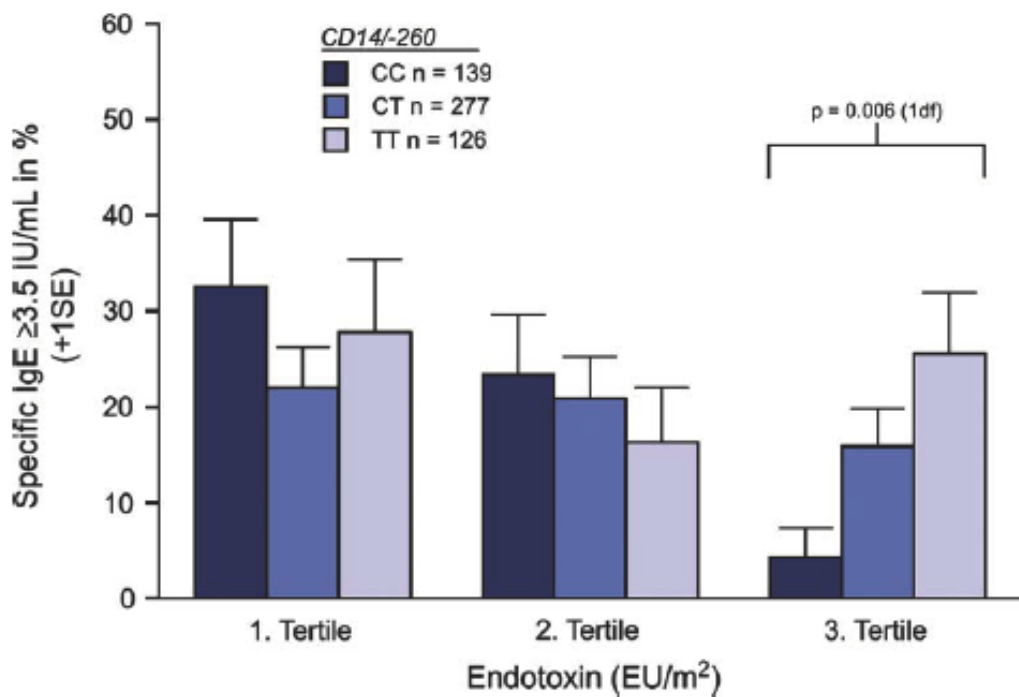
yorumlanabilir. *In-vitro* ortamda oluşturulan yüksek endotoksin konsantrasyonu TT genotipinde IgE düzeyinde artışa sebep olmakta CC genotipinde ise bir değişikliğe yol açmamaktadır. Bu sonuç, esas olarak çevresel endotoksin maruziyetinin ölçüldüğü çalışmalarla da uyum göstermektedir. Endotoksin maruziyet düzeyi ile atopi/IgE ve CD14 polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen üç çalışma vardır. İlk çalışmada Simpson ve arkadaşlarının bu modeli destekleyen çalışmalarında çocukların endotoksine maruziyetleri ölçülmüş ve CD14 CC genotipindeki çocuklarda düşük doz endotoksine maruz kalmaları halinde ev tozu akarı Der p1 IgE yanıtının yüksek, yüksek düzeyde endotoksine maruz kaldıklarında ise özgül IgE yanıtının TT genotipindeki çocuklara göre azaldığı gösterilmiştir (Simpson ve ark.,2006) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve sensitizasyon arasındaki ilişki. (Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE, Custovic A. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 386-92)

İkinci çalışmada ise CD14 geni promoter -260C→T polimorfizmi ile serum IgE düzeyleri ve maruz kalınan endotoksin düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yaşama alanlarında maruz kalınan endotoksin düzeyleri ile

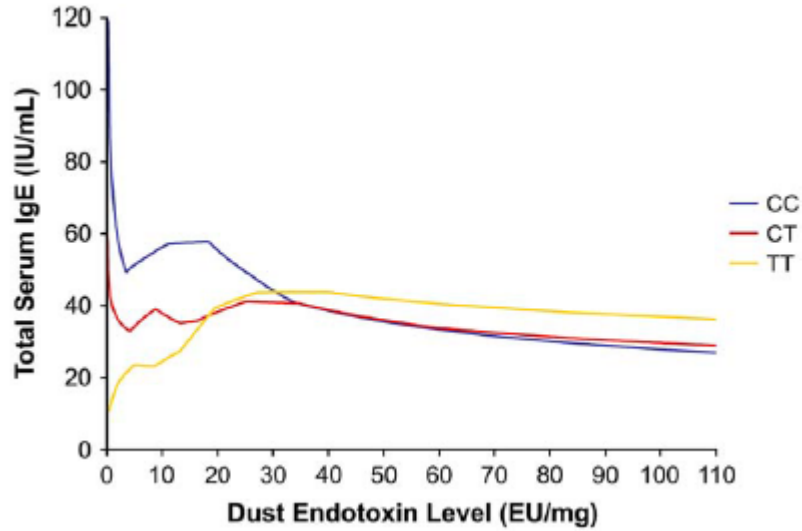
özgül IgE yanıtı arasındaki ilişkide CD14 -260 genotipinin etkili olduğu belirlenmiştir. Düşük düzeylerde endotoksine (98-12.494 ünite/m²) CD14 -260 CC genotipindeki çocuklar yüksek IgE yanıtı verirken, yüksek düzeylerde endotoksine (>30 ünite/m²) düşük IgE yanıtı vermektedirler. Yüksek yoğunlukta endotoksin ortamında CD14 -260 TT genotipindeki bireylerde CC genotipine kıyasla anlamlı yüksek IgE yanıtı vardır (Eder ve ark., 2005) (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve spesifik IgE pozitifliği arasındaki ilişki. (Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrländer C, Nowak D, Martinez FD; Allergy And Endotoxin Alex Study Team. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 601-7.)

Williams ve arkadaşlarının rapor ettiği üçüncü çalışmada ise bir doğum kohortunun annelerinin CD 14/-260 polimorfizmleri belirlenmiş, ev tozu endotoksinleri ölçülmüş ve evcil hayvan teması not edilmiştir. Düşük doz endotoksin temasında CC genotipli, yüksek doz endotoksin temasında

TT genotipli annelerde serum total IgE'nin yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.3). Evcil hayvan teması ile benzer şekilde bir ilişki bulunmamıştır (Williams ve ark., 2006).



Şekil 5.3. CD14 C159T polimorfizmi, endotoksin maruziyeti ve serum total IgE değerleri arasındaki ilişki (Williams LK, McPhee RA, Ownby DR, Peterson EL, James M, Zoratti EM, Johnson CC. Gene-environment interactions with CD14 C-260T and their relationship to total serum IgE levels in adults. Allergy Clin Immunol 2006; 118: 851-7).

IgE yanıtı ile endotoksin dozu arasındaki ilgi doğrusal olmaktan çok uzaktır. D Vercelli'nin 2003 yılında endotoksin dozu ile atopi/duyarlılık/IgE yanıtı arasında ilişkiyi açıklamak üzere önerdiği bimodal ilgiyi gösteren "endotoksin *switch*" 'e göre atopi/duyarlılık/IgE yanıtı yüksek endotoksin ve düşük endotoksin varlığında değişmekte ve bu değişim CD14 genotip polimorfizmlerine göre farklı şekilde IgE sentez yanıtı vermektedir (Vercelli, 2003).

CD14'ün immün sistem içinde özel bir görevi vardır. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile mikoplazmalarla karşılaşmada ilk koruyucu sistem olan doğal immünitede TLR4 reseptörü ile birlikte görev alır. Nötrofiller ve monositlerin yüzeyinde yer almanın yanında erir formdaki (*soluble*) sCD14

serumda bulunur ve yüzeyinde CD14 eksprese etmeyen endotelial ve epitel hücrelerinin patojen mikroorganizmalara verdiği koruyucu yanıtı kuvvetlendirir. Şehir ve kırsal kesimde maruz kalınan endotoksin düzeyleri ile allerjik hastalıklar arasındaki ilgide önemli görevlerden birini CD14'ün aldığı kuşkusuzdur. Th1 ve Th2 immün reaksiyonların oluşumunda mikrobiyel çevrenin etkili olduğunu ve bu etkileşimin allerjik hastalıklar ve atopi üzerinde arttırıcı veya azaltıcı etkilerini gözlemsel çalışmalardan bilmekteyiz. Bu araştırmada çevresel endotoksin maruziyetinin bir örneği farklı LPS dozları ile *in-vitro* koşulda oluşturulmuş ve hem gen ifadesi, hem de protein belirteci düzeyinde IgE üretiminin CD14 -159 TT genotipinde anlamlı bir artış lehine yanıt verdiğini gösterdik.

Bu çalışmanın bazı sınırlamaları da vardır. Çalışmamız temel olarak CD14 genindeki tek bir polimorfizm ve bunun etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Oysa birçok gen LPS'e yanıtı kontrol edebilir (Wong ve ark., 2000). Bunlar arasında TLR4 (Eder ve ark., 2004), LBP, MD2, Myd 88 sayılabilir. Ayrıca CD14 geninin başka bölgelerinde var olan ve C159T ile *linkage disequilibrium* gösteren başka değişkenlikler de de bu sonuca etki etmiş olabilir.

Immunoglobulin E homeostazının regülasyonu endotoksinden başka enfeksiyonlar, çevresel faktörler ve genetik çeşitliliğin kontrolü altındadır. IgE sentezinin en önemli basamağı olan sınıf değişim rekombinasyonu sitokinlerin kontrolü altındadır. Sadece IL-4 ve IL-13 değil, IL-18, IL-25, IL-33, IL-15, timik stromal lenfopoetin de Th2 yanıtı dönüşümü sağlar (Helmann, 2007). LPS de sadece CD14 aracılığı ile hücre içine transfer olmaz. Isı şok proteini 70 ve 90, kemokin reseptör 4 ve büyüme farklılaşma faktörü 5 CD14'den bağımsız LPS reseptörleri olarak tanımlanmışlardır (Triantafilou ve ark., 2001). Bu nedenle CD14 TT genotipindeki LPS'e karşı artmış IgE yanıtı farklı sitokinlerin ve başka reseptörlerinde bu olayda yer almasından kaynaklanabilir.

Sitokin sinyallerinin baskılayıcıları (SOCS); STATS, tirozin fosfataz ve CD45'in protein inhibitörleri IgE sentezinin negatif regülasyonunda önemlidir. SOCS ailesinin üyeleri sitokin sinyalleri ve LPS ve kemokinler gibi

diğer uyarılar ile tetiklenirler. JAK-STAT yolağını bloke ederek sitokin reseptörlerinden sinyalleri azaltırlar (Elliott ve Johnston, 2004). Sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (CTLA4) T hücrelerinde özellikle eksprese olan bir inhibitör kostimulatuar moleküldür. Bununla birlikte, IL-4 ile muamele edilmiş B hücrelerinde CD40 veya LPS uyarısı ile indüklenebilir. CTLA4 reseptörüne bağlanınca NFκB ve STAT6'nın baskılanması ile IgE sentezinde azalma meydana gelir (Pioli ve ark., 2000). CD14 TT genotipindeki LPS'e karşı artmış IgE yanıtı inhibitör yolların daha az aktif olması ile meydana gelebilir.

Bu çalışma CD14 geninin promotor bölgesi -159 lokusundaki C/T değişiminin IgE sentezi üzerine etkisi konusunda yeni bir veri sunmaktadır. CC ve TT genotipleri arasında epidemiyolojik gözlemlere göre farklı sonuç elde edilmesi endotoksinin *in-vitro* olarak yüksek dozda kullanılmasına bağlı olabilir. CD14 geninde yer alan diğer polimorfizmlerin araştırılması, bu yolda yer alan diğer sinyal moleküllerinin genotipe göre değişen aktivasyonlarının incelenmesi IgE sentezinin mekanizmasını daha ayrıntılı anlamamıza yardımcı olacaktır.

SONUÇLAR

1. Periferik kan mononükleer hücreleri 200 ng/ml konsantrasyonunda LPS ile uyarıldıktan sonra hücre kültürü süpernatantlarındaki IgE düzeyleri CD14 C159T polimorfizminin T allelinde C allele göre daha yüksektir.
2. CD14 C159T, TT genotipli bireylerin hücreleri *in-vitro* koşullarda LPS uyarılmasına verdiği yüksek IgE yanıtı doz-cevap eğrisi şeklinde olup 2 ng/ml LPS dozu ile elde edilen IgE konsantrasyonu ile 200 ng/ml LPS dozu ile elde edilen IgE konsantrasyonları arasında da anlamlı bir fark vardır.
3. Yüksek düzeyde endotoksin, CD14 C159T TT genotipine sahip astımlı çocuklarda IgE sentezini transkripsiyonel düzeyde etkileyerek artırmaktadır.
4. Araştırmamız CD14 C159T polimorfizmi CC ve TT genotipine sahip astımlı çocukların *in-vitro* koşullarda düşük ve yüksek LPS dozuna farklı düzeylerde IgE sentezi ile yanıt verdiğini göstermiştir. Bu bulgular “endotoksin switch” olarak önerilen bimodal hipotezle uyumludur.
5. IgE sentez mekanizmalarını anlamak için CD14 geninde yer alan diğer polimorfizmlerin araştırılması ve bu yolda yer alan diğer sinyal moleküllerinin genotipe göre değişen aktivasyonlarının incelenmesi önerilir.

KAYNAKLAR

1. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59: 897-913.
2. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102: 98-106.
3. Alexis N, Eldridge M, Reed W, Bromberg P, Peden DB. CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 31-5.
4. Arias MA, Rey Nores JE, Vita N, Stelter F, Borysiewicz LK, Ferrara P, Labéta MO. Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production. *J Immunol* 2000; 164: 3480-6.
5. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.
6. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Platts-Mills T, Pohunek P, Simons FE, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J; European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63: 5-34.
7. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998; 115: 257-69.
8. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 976-83.
9. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, Pedersen SE; GOAL Investigators Group. Can

- guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med*; 170: 836-44.
10. Bisgaard H, Simpson A, Palmer CN, Bønnelykke K, McLean I, Mukhopadhyay S, Phipps CB, Halkjaer LB, Lipworth B, Hankinson J, Woodcock A, Custovic A. Gene-environment interaction in the onset of eczema in infancy: filaggrin loss-of-function mutations enhanced by neonatal cat exposure. *PLoS Med* 2008; 5: e131.
 11. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J, Chateigner N, Gormand F, Just J, Le Moual N, Scheinmann P, Siroux V, Vervloet D, Zelenika D, Pin I, Kauffmann F, Lathrop M, Demenais F. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J Med* 2008; 359: 1985-94.
 12. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wüthrich B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 28-34.
 13. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347: 869-77.
 14. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320: 271-7.
 15. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344:1643-4.
 16. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54: 825-57.

17. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999;402(6760 Suppl):B5-11.
18. Cosentino G, Soprana E, Thienes CP, Siccardi AG, Viale G, Vercelli D. IL-13 down-regulates CD14 expression and TNF-alpha secretion in normal human monocytes. *J Immunol* 1995; 155: 3145-51.
19. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 21129-35.
20. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992; 176: 1387-98.
21. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 457-99.
22. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006; 355: 2226-35.
23. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD; Allergy And Endotoxin Alex Study Team. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 601-7.
24. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD; ALEX Study Team. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 482-8.
25. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002;196:1645-51.

26. Elliott J, Johnston JA. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004; 25: 434-40.
27. Fahy JV. Anti-IgE: lessons learned from effects on airway inflammation and asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1230-2.
28. Gao PS, Mao XQ, Baldini M, Roberts MH, Adra CN, Shirakawa T, Holt PG, Martinez FD, Hopkin JM. Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. *Clin Genet* 1999; 56: 164-5.
29. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 721-32.
30. Gerhold K, Blümchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, Löhning M, Wahn U, Hamelmann E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 110-6.
31. Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 2002; 30: 969-73.
32. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2007. <http://www.ginasthma.org>; National Heart, Lung, and Blood Institute National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report 2007.
33. Hellman L. Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention. *Biomed Pharmacotherapy* 2007; 61: 34-49.
34. Heumann D, Glauser MP, Calandra T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 49-55.

35. Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 2006; 368: 780-93.
36. Jabara HH, Vercelli D. Engagement of CD14 on monocytes inhibits the synthesis of human Igs, including IgE. *J Immunol* 1994; 153:972-8.
37. Jackola DR, Basu S, Liebeler CL, Willaert R, Luah SS, Oetting W, King RA, Blumenthal MN. CD14 promoter polymorphisms in atopic families: implications for modulated allergen-specific immunoglobulin E and G1 responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139: 217-24.
38. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1532-9.
39. Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, Mutius E, Bein G. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* 2004; 59: 520-5.
40. Kang HJ, Choi YM, Chae SW, Woo JS, Hwang SJ, Lee HM. Polymorphism of the CD14 gene in perennial allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 2081-5.
41. Kedda MA, Lose F, Duffy D, Bell E, Thompson PJ, Upham J. The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. *Thorax* 2005; 60: 211-4.
42. Keskin O, Birben E, Saçkesen C, Soyer OU, Alyamaç E, Karaaslan C, Tokol N, Ercan H, Kalayci O. The effect of CD14-c159T genotypes on the cytokine response to endotoxin by peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 321-8.
43. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER. Association of a promoter

- polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 965-9.
44. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2375-81.
 45. Leung TF, Tang NL, Sung YM, Li AM, Wong GW, Chan IH, Lam CW. The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 255-60.
 46. LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 2001; 167: 5838-44.
 47. Leynaert B, Guilloud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guénégou A, Pin I, Neukirch F. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 658-65.
 48. Liu AH, Zasloff MA, Johnston RB (2008). *Innate Immunity. "Middleton's Allergy, Principle and Practice"* (Ed. NF Adkinson, BS Bochner, WW Busse, ST Holgate, RF Lemanske, FER Simons) Elsevier Inc., Philadelphia, s:19-35.
 49. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109: 379-92.
 50. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469-78.
 51. Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Pauwels R, Sergysels R. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1641-6.

52. Nightingale JA, Rogers DF, Hart LA, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled endotoxin on induced sputum in normal, atopic, and atopic asthmatic subjects. *Thorax* 1998; 53: 563-71.
53. Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 2000; 97: 43-9.
54. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1154-62.
55. O'Donnell AR, Toelle BG, Marks GB, Hayden CM, Laing IA, Peat JK, Goldblatt J, Le Souëf PN. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 615-22.
56. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 429-40.
57. Pioli C, Gatta L, Ubaldi V, Doria G. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J Immunol* 2000; 165: 5530-6.
58. Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* 1993; 151: 1280-9.
59. Punnonen J, Yssel H, de Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 792-801.
60. Reed C, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 157-66.
61. Rey Nores JE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, Lefort S, Borysiewicz LK, Ferrara P, Labéta MO. Soluble CD14 acts

as a negative regulator of human T cell activation and function. *Eur J Immunol* 1999; 29: 265-76.

62. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358: 1129-33.
63. Rizzo MC, Naspitz CK, Fernández-Caldas E, Lockey RF, Mimiça I, Solé D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8: 121-6.
64. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004; 112: 352-63.
65. Saçkesen C, Karaaslan C, Keskin O, Tokol N, Tahan F, Civelek E, Soyer OU, Adalioglu G, Tuncer A, Birben E, Oner C, Kalayci O. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60: 1485-92.
66. Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, Lau S, Baldini M, Martinez F, Wahn U, Nickel R; German Multicenter Allergy Study Group. Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 166-9.
67. Sharma M, Batra J, Mabalirajan U, Goswami S, Ganguly D, Lahkar B, Bhatia NK, Kumar A, Ghosh B. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. *Immunogenetics*. 2004; 56: 544-7.
68. Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE, Custovic A. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 386-92.

69. Steege JC, van de Ven MW, Forget PP, Brouckaert P, Buurman WA. The role of endogenous IFN-gamma, TNF-alpha and IL-10 in LPS-induced nitric oxide release in a mouse model. *Cytokine* 1998; 10: 115-23.
70. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354: 541-5.
71. Stríz I, Mio T, Adachi Y, Bazil V, Rennard S. The CD14 molecule participates in regulation of IL-8 and IL-6 release by bronchial epithelial cells. *Immunol Lett* 1998; 62: 177-81.
72. Takeuchi K, Suzuki S, Yagawa M, Yuta A, Majima Y. A CD14 gene polymorphism is associated with the IgE level for *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 966-71.
73. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2001; 2: 338-45.
74. Tulic MK, Manoukian JJ, Eidelman DH, Hamid Q. T-cell proliferation induced by local application of LPS in the nasal mucosa of nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:771-6.
75. Tulić MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 604-12.
76. Vercelli D (2008). Immunobiology of IgE. "Middleton's Allergy, Principle and Practice" (Ed. NF Adkinson, BS Bochner, WW Busse, ST Holgate, RF Lemanske, FER Simons) Elsevier Inc., Philadelphia, s:115-128
77. Vercelli D, Baldini M, Stern D, Lohman IC, Halonen M, Martinez F. CD14: a bridge between innate immunity and adaptive IgE responses. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 45-8.

78. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 169-82.
79. Vercelli D. Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:381-6.
80. Vercelli D. Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 153-5.
81. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 187-93.
82. Von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1230-4.
83. Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* 2007; 212: 433-9.
84. Wang JY, Wang LM, Lin CG, Chang AC, Wu LS. Association study using combination analysis of SNP and STRP markers: CD14 promoter polymorphism and IgE level in Taiwanese asthma children. *J Hum Genet* 2005; 50: 36-41.
85. Williams LK, McPhee RA, Ownby DR, Peterson EL, James M, Zoratti EM, Johnson CC. Gene-environment interactions with CD14 C-260T and their relationship to total serum IgE levels in adults. *Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 851-7.
86. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258-61.
87. Wong PM, Chugh SW, Sultzzer BM. Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin. *Scand J Immunol* 2000; 51: 123-7.

88. Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 438-44.
89. Ying S, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, Kay AB, Durham SR. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 686-92.
90. Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Stockton ML, Grant AV, Zhang S, Levett PN, Beaty TH, Barnes KC. Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1203-9.
91. Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. *J Immunol* 1991; 146: 1836-42.