

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROMATİZMAL KALP HASTALIĞINDA  
PTPN22 ( PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE  
NON-RECEPTOR TYPE 22 ) GEN POLİMORFİZMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Rahime AKSOY**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI DİYAGNOSTİK İMMÜNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof Dr. Nurşen DÜZGÜN**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09.03.2010

Prof.Dr. Nurşen DÜZGÜN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Nejat AKAR  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof.Dr. Gülay KINIKLI  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof.Dr. Ümit ÖLMEZ  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof.Dr. Hüseyin TUTKAK  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



## İÇİNDEKİLER

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| Kabul ve Onay                                                     | ii  |
| İçindekiler                                                       | iii |
| Önsöz                                                             | iv  |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                           | v   |
| Şekiller                                                          | vi  |
| Çizelgeler                                                        | vii |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                   | 1   |
| 1.1. Romatizmal Kalp Hastalığı (RKH)                              | 2   |
| 1.1.1. Akut Romatizmal Ateş (ARA) Tanımı                          | 2   |
| 1.1.2. Akut Romatizmal Ateş İnsidansı                             | 3   |
| 1.1.3. Epidemiyoloji                                              | 4   |
| 1.1.4. Etiyoloji                                                  | 4   |
| 1.1.5. Genetik Yatkınlık                                          | 4   |
| 1.1.6. Moleküler Benzerlik                                        | 6   |
| 1.1.7. İmmün Patogenez                                            | 7   |
| 1.1.8. Romatizmal Kalp Hastalığı ve TCR (T-hücre Reseptör)        | 10  |
| 1.1.9. Romatizmal Kalp Hastalığında Sitokinler                    | 11  |
| 1.1.10. Akut Romatizmal Ateş Tanısı                               | 12  |
| 1.1.11. Romatizmal Kalp Hastalığı ile İlişkili Genetik Çalışmalar | 15  |
| 1.2. Protein Tirozin Fosfataz Non Reseptör 22 (PTPN 22)           | 16  |
| 1.2.1. PTPN 22 Geni                                               | 16  |
| 1.2.2. PTPN 22 Geninin Klonlaması                                 | 17  |
| 1.2.3. PTPN 22 Geninin Fonksiyonları                              | 18  |
| 1.2.4. PTPN 22 Geninin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi            | 19  |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                         | 21  |
| 2.1. Hasta Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması                      | 21  |
| 2.2. PTPN 22 R620W Gen Polimorfizminin Belirlenmesi               | 21  |
| 2.3. DNA'nın Elde Edilmesi                                        | 22  |
| 2.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)                              | 24  |
| 2.5. Kesim Parçacıkları Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)               | 26  |
| 2.6. Agaroz Jel Elektrophorezi                                    | 27  |
| 2.7. İstatistiksel Analiz                                         | 30  |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                | 31  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                | 33  |
| <b>5. SONUÇ</b>                                                   | 38  |
| <b>ÖZET</b>                                                       | 39  |
| <b>SUMMARY</b>                                                    | 40  |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                  | 41  |
| <b>EKLER</b>                                                      | 52  |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                   | 53  |

## ÖNSÖZ

Romatizmal ateş, infeksiyöz bir ajanın başlattığı, moleküler benzerlik yolu ile gelişen ve otoimmün reaksiyon ile oluşan multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır.

Romatizmal ateşin kalbi tutması sonucu ortaya çıkan kalp bozukluk ve hastalıklarına “Romatizmal kalp hastalığı” denilmektedir. Çalışmamızda romatizmal kalp hastalığı gelişmesinde, genetik yatkınlık açısından PTPN22 geni R620W polimorfizminin katkısının olup olmadığını araştırdık.

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı İmmünoloji laboratuvarında 2009-2010 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamıza sağladığı katkılarından dolayı, danışman hocam Prof. Dr. Nurşen Düzgün’e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tezimin yapım aşamalarında gösterdikleri yardımlarından dolayı, laboratuvar sorumlumuz Prof. Dr. Hüseyin Tutkak’a ve Dr. Biyolog Türker Duman’a; dostluk ve yardımlarıyla hep yanımda olan çalışma arkadaşlarıma; iyi ve kötü günümde her zaman yanımda olan sevgili eşim ve biricik oğluma; öğrenim hayatımın ilk gününden bugüne kadar maddi - manevi destekleri ve sevgileri ile hep yanımda olan çok değerli annem ve babama sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ARA: Akut Romatizmal Ateş

ASO: Anti-Streptolysin-O

CSK : C-terminal Src kinase (Src adlı tirozin kinazının, Src C-ucu kinaz)

CBL : Casitas B-lineage lymphoma

HLA : Human Leukocyte Antigens (İnsan Lökosit Antijenleri)

HRA: Heart Reactive Antibodies

mAb: Monoclonal antibody (Monoklonal antikor)

MHC : Major Histocompatibility Complex (Majör Doku Uygunluk Kompleksi)

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik Kan Mononükleer Hücre)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PEST :Proline, Glutamic acid, Serine, and Threonine.

(Prolin ,Glutamik Asit,Serin ve Tironin)

PTPN 22 : Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 22

(Protein Tirozin Fosfataz, Reseptör olmayan Tip 22)

RKH: Romatizmal kalp Hastalığı

SAg : Superantigen (Süperantijen)

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

SMEZ :Streptococcal Mitogenic Exotoxin (Streptokokal Mitojenik Ekzotoksin)

SRC : Src ailesi Protein kinaz

SSA : Streptococcal Superantigen (Streptokokal Süper Antijen)

TBE : Tris, Borikasit EDTA

TNF : Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktör)

TCR : T Cell Receptor (T hücre reseptör)

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule (Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü)

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                 | <b><u>Sayfa</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Şekil 1.1.</b> RKH ‘nın dünyadaki prevelansı.                                                                                | 4                   |
| <b>Şekil 1.2.</b> A Grubu Beta Hemolitik Streptokok ile çapraz reaksiyon veren dokular.                                         | 9                   |
| <b>Şekil 1.3.</b> PTPN 22 geni.                                                                                                 | 18                  |
| <b>Şekil 1.4.</b> PTPN 22 gen lokasyonu.                                                                                        | 18                  |
| <b>Şekil 2.1.</b> PTPN 22 geninin 4.ekzonunun baz dizisi.                                                                       | 27                  |
| <b>Şekil 2.2.</b> XcmI restriksiyon enziminin tanıdığı dizi.                                                                    | 29                  |
| <b>Şekil 2.3.</b> PTPN22 geni R620W polimorfizminin XcmI Enzimi ile kesimi sonrası %2,5’luk agaroz jelde elektroforez görünümü. | 32                  |
| <b>Şekil 2.4.</b> ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker. (% 1,7 Agaroz Jel)                                                           | 32                  |

**ÇİZELGELER**

|                                                                                                                                   | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Çizelge 1.1.</b> ARA /RKH HLA ve non-HLA Genleri                                                                               | 6                   |
| <b>Çizelge 3.1.</b> RKH Hastalarında ve Sağlıklı Kontrollerde PTPN22 Geni R620W Polimorfizmi Genotip Dağılımları ve Allel Sıklığı | 35                  |

## 1. GİRİŞ

Akut Romatizmal Ateş (ARA), A grubu beta hemolitik streptokoklara bağlı olarak gelişen farenjitten 1-4 hafta sonra ortaya çıkan multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalık sıklıkla 5-15 yaşlarında görülür (Sainani, 2006). Cinsiyet ve ırk ayrımı gözetmez ancak ailesel eğilim önemlidir. Farenjite yol açan streptokok enfeksiyonu geçiren tedavi edilmemiş veya yetersiz tedavi edilmiş tüm hastaların %3'ünde ARA gelişir. Hastalığın majör bulguları poliartrit, kardit, korea, eritema marginatum ve subkütan nodüllerdir. Hastaların %30-45'inde kardit geliştiğinde perikard, miyokard ve endokard hasarına neden olur. İlerleyici ve kalıcı olan kalp kapak lezyonları romatizmal kalp hastalığı(RKH) olarak bilinir ve hastalığın en çok korkulan komplikasyonudur (Carepetis ve ark., 2005).

Çalışmalarda A grubu beta hemolitik streptokok M proteini ile insan kalp dokusu, örneğin kardiyak miyozin arasında moleküler bir benzerlik gösterilmiştir (Kaplan, 1964a). İmmün sistem enfeksiyöz ajana karşı savunma yaparken benzer yapıya sahip olan kalp dokusuna karşı da reaksiyon vererek doku hasarına yol açmaktadır. Bu reaksiyon moleküler benzerlik esasına dayanan otoimmün bir reaksiyondur (Fae ve ark., 2005). Bu tip reaksiyon ile oluşan otoimmün hastalıklarda genetik yatkınlık, sorumlu olabilecek faktörlerden bir bölümünü oluşturmaktadır. ARA gelişmesinde de başlatıcı mikrobik ajan dışında genetik faktörlerin (HLA ve non-HLA genleri gibi) katkısı araştırılmaktadır (Guilherme ve ark., 1991; Haydardedeoğlu ve ark., 2006; Düzgün ve ark., 2004; Düzgün ve ark., 2007).

Non-HLA genlerinden kromozom 1p13'te lokalize olan PTPN22 geni, lenfoid-spesifik protein tirozin fosfatazı kodlar. Hücre içi tirozin fosfataz ailesinden olan bu molekül, lenfositlerin dinlenme fenotipinin korunmasında ve antijen/sitokin tarafından indüklenen sinyalizasyonun kontrolünde yer alır. PTPN22 geninde R620W (arginin/ triptofan) aminoasit değişikliği, erken T-hücresi reseptör sinyalinin down regülasyonuna ve dolayısıyla oto reaktif T-hücresi oluşumunda artışa neden olur. PTPN22 R620W polimorfizminin pek çok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bunlardan bazıları; sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit,

Tip I Diabetes Mellitus sayılabilir (Kyogoku ve ark., 2004; Begovich ve ark., 2004; Bottini ve ark., 2004).

Akut romatizmal ateş, infeksiyöz bir ajanın başlattığı, moleküler benzerlik yolu ile gelişen ve otoimmün reaksiyon ile oluşan multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Genetik yatkınlığın rolü konusunda araştırmalara gereksinim olduğu açıktır. Bu araştırmaların çoğu gelişmiş toplumlardan ziyade bu hastalığın daha sık görüldüğü gelişmekte olan ülkelerde yapılmaktadır. Ülkemizde geçmiş yıllara göre daha az sıklıkla karşılaştığımız akut romatizmal ateşin sekeli olan kronik kapak hastalığında daha önce araştırılmamış olan PTPN22 gen R620W polimorfizmin araştırılmasının hastalık patogenezin ve literatür bilgilerine katkı sağlayabileceğini umut ediyoruz.

## **1.1. ROMATİZMAL KALP HASTALIĞI (RKH)**

### **1.1.1. Akut Romatizmal Ateş Tanımı**

Akut Romatizmal Ateş (ARA), grup A beta hemolitik streptokok ile gelişen farenjiyal infeksiyonunun gecikmiş bir komplikasyonudur (Bisno , 1991). Ancak boğazında bu tip bakteri bulunan her birey romatizmal ateşe yakalanmaz. Bireysel yatkınlık hastalığın gelişmesinde rol oynar. Bazı bireyler hasta olmadan bu mikroorganizmayı taşıyabilirler. Streptokokkal farenjit sonrası ARA görülme olasılığı sporadik vakalarda %0,3, salgınlarda %3'dür. İnflamatuvar lezyonlar beyin, kalp, eklem ve deride gelişir. Kalıcı kapak lezyonları en sık mitral ve daha az sıklıkta aort kapaklarında oluşur. Triküspit ve pulmoner kapak tutulumları çok nadirdir.

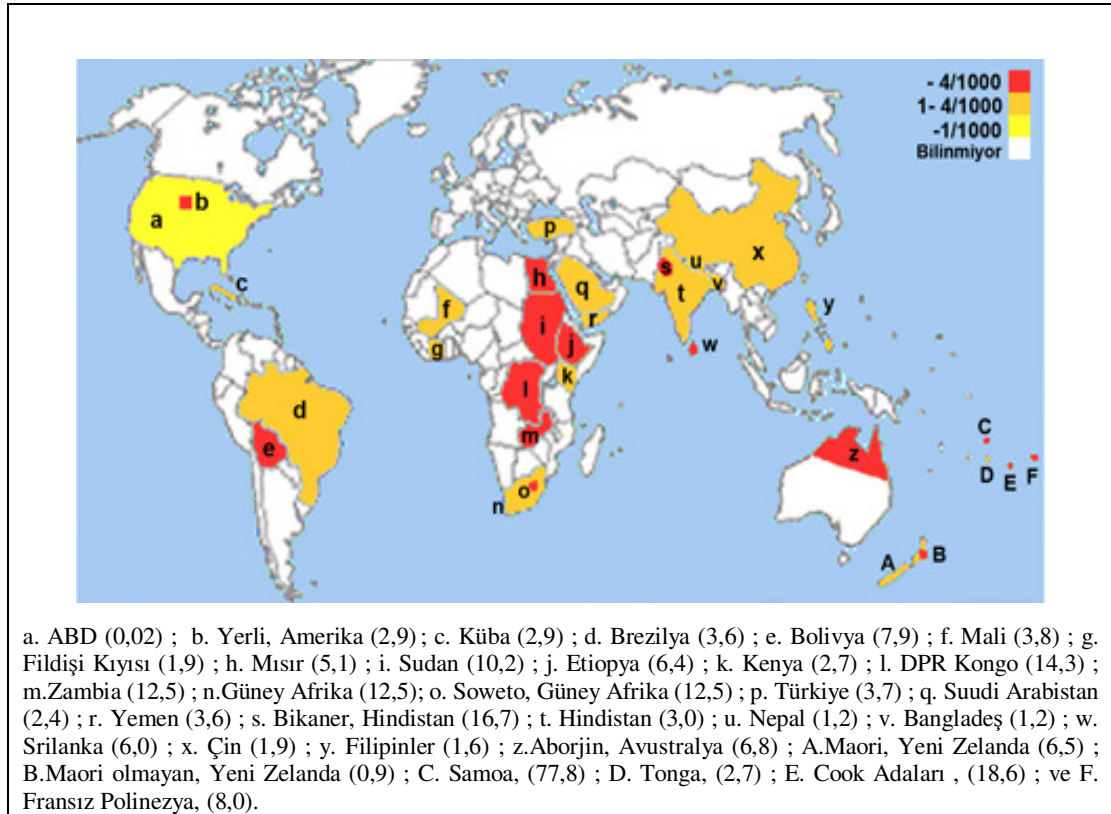
Eklemlerde akut başlangıçlı gezici nitelikte ağrı, şişlik, kızarıklık ve sıcaklık; kalpte kapak hasarı ve kalp yetersizliği; istem dışı hareketler; deride kırmızı renkte döküntüler, deri altında nodüler şişlikler gösteren bir hastalıktır. Eklem, cilt ve nörolojik belirtilerin geçici olmasına karşın, kalp kapaklarının etkilenmesi ömür boyu kalıcı kalp hastalığı oluşturur.

Hastalığın eklemlerde kalıcı bozukluk bırakmaması ve kalpte kalıcı hasar bırakması nedeniyle “Eklemleri yalar, kalbi ısırır.” deyiimi kullanılır (Galal ve ark., 1998 ).

### 1.1.2. Akut Romatizmal Ateş İnsidansı

Sosyo ekonomik durumun düzelmesi, antibiyotiklerin yaygın kullanımı ve ev ile okullarda kalabalık ortamın önlenmesi nedeniyle gelişmiş ülkelerde insidans oldukça düşürülmüşken, gelişmekte olan ülkelerde halen çok önemli bir sağlık problemidir. İnsidans örneğin ABD de 0,5-3.1/100.000 iken, Sri Lanka da 100-150/100.000 dir. RKH dünyadaki prevalansı Şekil 1.1 ‘de gösterilmiştir.

Ülkemizde romatizmal kalp hastalığı prevalansı 1999'da yapılan bir çalışmaya göre 0.73/1000, kümülatif prevalans hızı ise 3.7/1000 olarak bulunmuştur. Bu oranlar 1975 yılına göre hastalığın 9-10 kat azaldığını göstermekte ise de ARA halen ülkemiz için önemli bir sağlık sorunudur ( Olguntürk ve ark., 2006 ).



Şekil 1.1 - RKH'nın Dünyadaki Prevalansı (Bryant ve ark., 2009)

### 1.1.3.Epidemiyoloji

ARA, günümüzde hala birçok ülkede 5-15 yaş grubu arasında kalp hastalığından dolayı ölüm sebepleri arasında önemli bir yer teşkil etmektedir. Özellikle endüstrileşen 3. Dünya Ülkelerinin sosyal düzeyi düşük kesimlerinde önemli bir halk sağlığı problemidir (Carapetis ve ark., 2005). Kadın ve erkek arasında sıklık farkı görülmemektedir.

### 1.1.4.Etyoloji

Hastalık, A grubu Beta hemolitik streptokok sonucu gelişen üst solunum yolu infeksiyonlarından (ÜSYE) 1-4 hafta sonra süpüratif olmayan bir komplikasyon olarak ortaya çıkar. Derinin streptokokal infeksiyonu sonrasında ARA gelişmemektedir (Wannamaker , 1970 ). En fazla 5-15 yaş arası çocuklarda, ÜSYE'nin sık görüldüğü mevsimlerde örneğin kış sonu, ilkbahar başında ve ılıman iklimlerde daha sıktır. Kalabalık yerlerde (okul, kışla, yurt, kalabalık aile) ve sosyo ekonomik durumun düşük olduğu toplumlarda sıktır (Galal ve ark., 1998; Ayoub, 2001 ).

### 1.1.5.Genetik Yatkınlık

ARA'ya genetik yatkınlık hakkındaki araştırmalarla ilgili tartışmalar devam etmektedir. İkizlerde yapılan çalışmalarda çift yumurta ikizlerindeki konkordans %2,5, tek yumurta ikizlerinde bu oran % 18 bulunmuştur. ARA ile HLA antijenleri arasındaki ilişki, artan sıklıkla rapor edilmektedir (Çizelge 1.1)

Bu ilişki daha çok HLA - DR lokusunda yoğunlaşmıştır. Bunların içinde en sık HLA - DR4, daha az sıklıkta HLA - DR2, DR3 ve DR53 ile ilişki olduğu bildirilmektedir.

**Çizelge 1.1 - ARA /RKH HLA ve non-HLA Genleri (Guilherme ve ark., 2004)**

| Ülke            | Popülasyon                 | Klinik          | Gen      | HLA class II allelleri |
|-----------------|----------------------------|-----------------|----------|------------------------|
| HLA-DRB1        |                            |                 |          |                        |
| Güney Afrika    | Afrikalı                   | ARA/RKH         |          | DR1                    |
| Brezilya        | Melez                      | Sydenham Koresi |          | „                      |
| ABD             | Afrikalı Amerikan ve Melez | ARA/RKH         |          | DR2                    |
| Meksika         |                            | RKH             |          | „                      |
| Hindistan       | Hindu                      | ARA/RKH         |          | DR3                    |
| Türkiye         | Türk                       | RKH             |          | „                      |
| ABD             | Beyaz Amerikan             | ARA/RKH         |          | DR4                    |
| Suudi Arabistan | Arap                       | ARA/RKH         |          | „                      |
| Türkiye         | Türk                       | RKH             |          | DR11(5), DR7           |
| Brezilya        | Melez ve Beyaz             | ARA/RKH         |          | DR7                    |
| Mısır           | Mısırlı                    | RKH             |          | „                      |
| Litvanya        | Litvanyalı                 | ARA/RKH         |          | „                      |
| Japonya         | Japon                      | RKH             | HLA-DQA1 | DQA1 0104              |
|                 |                            |                 | HLA-DQB1 | DQB1 0503              |
| Non-HLA         |                            |                 |          |                        |
| TNF- $\alpha$   |                            |                 |          | SNP                    |
| Brezilya        | Melez ve Beyaz             | ARA/RKH         |          | -308G/ A               |
| Meksika         | Meksikalı                  | RKH             |          | -238G/ A               |
| MBL             |                            |                 |          | SNP                    |
| Brezilya        | Melez ve Beyaz             | RKH             |          | 54B                    |
|                 | Beyaz                      | RKH             |          | 52D                    |

Brezilya, Türkiye, Mısır ve Litvanya RKH hastalarında DR7 ilişkisi rapor edilmiştir (Guédez ve ark., 1999; Guilherme ve ark., 1991; Guilherme ve ark., 1995; Haydardedeoğlu ve ark., 2006; Ozkan ve ark., 1993, Visentainer ve ark., 2000). Mısır ve Litvanya RKH hastalarında HLA-DR7 alleliyle birlikte HLA-DQ2'nin bulunmasının, özellikle multiple kalp kapak lezyonlarının gelişmesindeki önemi vurgulanmıştır (Guédez ve ark., 1999; Stanevicha ve ark., 2003). HLA-DR4 alleli ise

Amerika (Anastasiou-Nana ve ark., 1986; Ayoub ve ark., 1986), Suudi Arabistan (Rajapakse ve ark., 1987) ve Hint popülasyonlarında (Bhat ve ark., 1997) ilişkili bulunmuştur. Brezilya popülasyonunda DR7 ve DR4 allellerinin her ikisinin DR53 ile birlikteliğinin ARA/RKH'nın oluşmasında rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Guilherme ve ark., 1991; Weidebach ve ark., 1994). Diğer HLA Class II antijenlerinin ise daha az sıklıkla bu hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Anastasiou-Nana ve ark., 1986; Guédez ve ark., 1999; Hernández-Pacheco ve ark., 2003; Jhinghan ve ark., 1986; Koyanagi ve ark., 1996; Maharaj ve ark., 1987; Monplaisir ve ark., 1986; Olmez ve ark., 1993). Ancak, MHC Class II molekülünün otoimmün hastalığa nasıl yatkınlık oluşturduğunun moleküler mekanizması açık değildir.

Antijen sunan hücrelerin (makrofaj, dendritik hücreler ve B hücreleri gibi) yüzeyinde exprese olan HLA Class II molekülleri TCR'ye (T hücre reseptör'e) antijen sunar. Bu da adaptif immün cevapla T-hücre aktivasyonunu başlatır. HLA Class II allelleri (HLA-DR, HLA-DR53) bazı streptokokkal peptitlerin sunumunu kolaylaştırıyor olabilir. Bunun sonucunda da otoimmün reaksiyon başlayabilir. Birçok B lenfosit antijenlerinin ARA ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlardan biri olan D8/17 alloantijenlerinin varlığı ile ARA arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (Harrington ve ark., 2006).

#### **1.1.6. Moleküler Benzerlik**

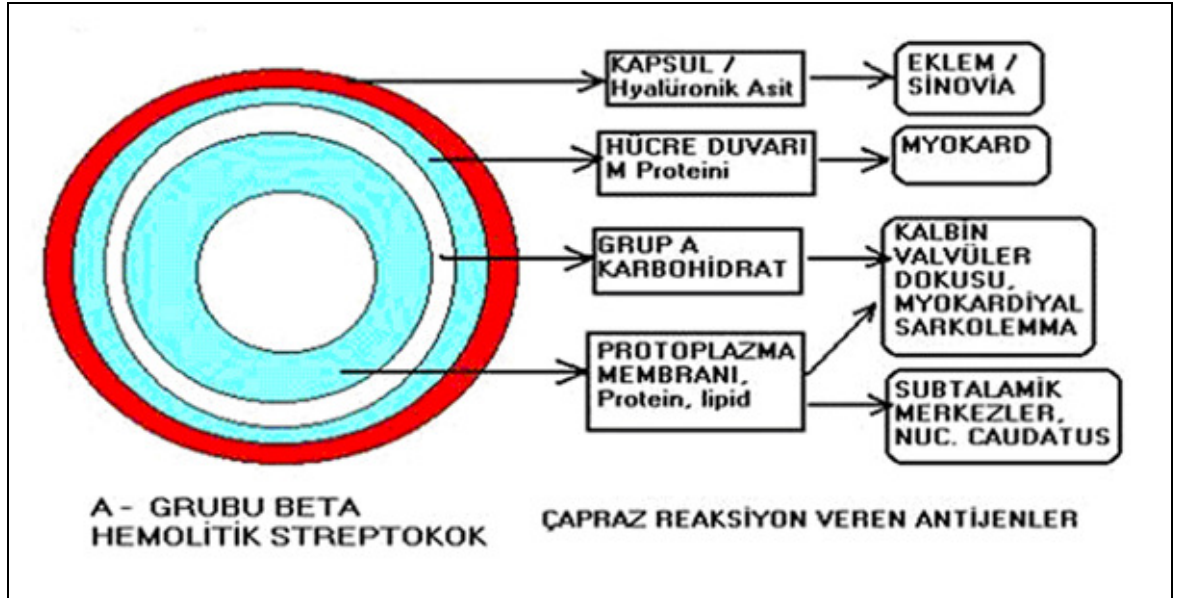
ARA, insan patolojik otoimmünitesinde moleküler taklitçiliğin veya benzeşmenin en önemli örneğidir. Beta hemolitik streptokokların (M 1, 3, 5, 6, 14, 18, 19, 27, 29 tiplerinin) M proteini ile sarkolemmal antijenler tropomiyozin ve miyozin arasındaki moleküler benzerlik, çapraz reaksiyon meydana gelmesine ve ARA'nın ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Martin ve ark., 2006). S. pyogenes'in M5 proteini; 81-96 aminoasiti kapsayan peptidinin kalp doku proteinleri ile çapraz reaksiyona girdiğini, otoimmün reaksiyona neden olduğunu Guilherme ve arkadaşları da çalışmalarında bildirmişlerdir (Guilherme ve ark., 2001). Bu moleküler benzerlikler sonucu

miyokard ve endokarda karşı gelişen antikorlar, anti sarkolemmal antikor ile çapraz reaksiyona, miyokard (*Aschoff nodüllerinde*) ve tutulmuş olan kalp kapaklarında (Endocarditis verrucosa) immün kompleks birikimine (tip III immünkompleks reaksiyonu) neden olurlar. Chorea minor gelişen hastalarda da nukleus caudatus ve nukleus subtalamus antijenlerine karşı çapraz reaksiyon veren antikorlar bulunmuştur.

### 1.1.7. İmmün Patogenez

ARA'lı hastaların serumunda kalp ile etkileşim gösteren antikorlar (HRA) bulunmuştur. Streptokok antijenlerine karşı oluşan antikorlar, hasta bireyin bazı normal dokuları ile çapraz reaksiyona girmekte ve doku hasarına neden olmaktadır. Uzun dönemde kalsifikasyon ve fibrozis ile sonlanan bazal gangliyon ve serebellar lezyonlar ise Sydenham Koresinin patogenezinde rol oynar.

A grubu beta hemolitik streptokokların hücre duvarı 3 yapısal elemandan oluşur. Temel eleman peptidoglikandır ve deneysel olarak artrite ve nodül oluşumuna neden olurlar. Polisakkarid (grup spesifik karbonhidrat) ile kalp kapak dokusunda bulunan glikoprotein arasında antijenik benzerlik vardır. Üçüncü eleman M, R ve T proteinleridir. M proteinleri ile myokardın sarkolemması arasında antijenik benzerlik vardır. Streptokok protoplazma membranı ile subtalamik ve kaudat nukleuslar arasında moleküler benzerlik vardır. ARA'nın etkileri, bu immünolojik benzerlikler sonucu oluşmaktadır (*Şekil 1.2*)



**Şekil 1.2 - A Grubu Beta Hemolitik Streptokok ile Çapraz Reaksiyon Veren Dokular**

**Humoral yanıt:** Kaplan ve Suchy, 1964 yılında ARA/RKH hastalarında streptokokal antijenler ile kalp antijenlerinin çapraz reaksiyonunu göstermişlerdir (Kaplan, 1964a). Araştırmacılar moleküler taklitçilik terimini, insan ve streptokokal antijenleri arasında oluşan çapraz reaktif mekanizma için kullanmışlardır. Kaplan ve Svec, kullandıkları immün floresans teknik ile ARA hastalarında immünglobulin ve kompleman bağlanmış miyokardiyum bulmuşlardır. ARA'nın antikorların çapraz reaksiyonu sonucu oluşan bir otoimmün hastalık olduğu hipotezini desteklemişlerdir (Kaplan, 1964b).

Cunnigham ve arkadaşlarının yaptığı birçok çalışmada insan mAb'lerinin (monoklonal antikorların) N-asetil  $\beta$ -D glukozamin ile reaksiyon verdiği gösterilmiştir (Cunnigham ve ark., 1997). Ayrıca invitro koşullarda insan ve fare mAb'lerinin sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir. Bu antikorların kalp hücrelerinin ekstrasellüler matriks  $\alpha$ -helikal büküm proteinleri ile çapraz reaksiyon verdiği belirtilmiş ve bu çapraz reaktif mAb'ların RKH'nin gelişiminde büyük potansiyele sahip olduğu aydınlatılmıştır (Gulizia ve ark., 1991; Adderson ve ark., 1998; Shikhman, 1994). Aynı grup mAb'ların endotel yüzeyinde de aynı reaksiyonu gösterip inflamasyonda rol oynadığı tespit edilmiştir (Galvin ve ark., 2000). Bu reaksiyon VCAM-1 adhezyon molekülüyle çapraz reaksiyon vererek olur ve valvüler

endotelyumunun hücrel infiltrasyonuna olanak sağlar.

Ayrıca otoantikorların Sydenham koresinde büyük rol oynadığı bilinir. ARA olgularının %10-30'unda Sydenham koresi meydana gelir. Ya tek başına ya da diğer bulgularla (örneğin kardit veya poliartrit) birlikte meydana gelir. Sydenham koresine neden olan otoantikorlar nöral hücrelere karşı gelişirler ve ganglionların N-asetil  $\beta$ -D glukozaminlerine karşı çapraz reaksiyon verirler. Bu reaksiyon hücre içi sinyalleri aktive ederek kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein-kinaz II'i etkileyerek nöral hücrelerden dopamin salınmasına neden olur (Kirvan ve ark., 2003).

**Hücrel Yanıt:** ARA/RKH hastalarında hücrel yanıt mekanizmasını anlamak için yapılan ilk çalışma periferik kanda streptokokkal hücre duvarına karşı reaktif T-hücre aktivitesinin gösterilmesidir (Read ve ark., 1974; Gray ve ark., 1981; Gross, 1984).

Yapılan bir diğer çalışmada, ARA hastalarının tonsillerinde ve periferik kanlarında CD4+ hücrelerinin artışı sağlıklı grupla kıyaslanarak gösterilmiştir (Bhatia ve ark., 1989).

Başka bir çalışmada normal periferik kanda CD8+T hücrelerinin immortal insan kalp kası hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi tanımlanmıştır. Bu hücrelerin kardit ve valvüler lezyonların gelişimine yol açtığı, dolayısıyla RKH'nin T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olduğu öngörülmüştür (Dale ve ark., 1981; Kotb ve ark., 1989).

RKH'nin histopatolojik göstergesi olan Aschoff nodülleri, 1903'te tanımlanmıştır. Bu granümatöz lezyon, T ve B lenfositleri, makrofajları, büyük mononükleer hücreleri, multinükleer hücreleri, polimorfonükleer lökositleri içerir (Roberts, 1978, Virmani, 1977). Aschoff nodülleri hücrel infiltrasyon sonucunda miyokarda ve endokarda gelişir. Romatizmal kalp lezyonlarında mononükleer hücre infiltrasyonu varlığında, CD4+T hücreleri çoğunluğu oluşturur.

RKH'de, Grup A streptokoklarla kalp dokusu arasında moleküler benzerliğin lokal doku yıkımına neden olduğu T hücre repertuarının analizi ile gösterilmiştir

(Guilherme ve ark., 1995). Şiddetli RKH olan hastaların T- hücrelerinin yoğun bulunduğu kalp lezyonlarından T-hücre klonları izole edilmiştir. Böylece M protein peptitleri ve kalp dokusu proteinleri arasındaki çapraz reaksiyon gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kalp doku proteinleriyle çapraz reaksiyona giren ve valvüler dokulardan sağlanan 95-100 ve 30-43 kDa ağırlığında 3 tip M5 bölgesi (1-25, 81-103, 163-177) bulunmuştur. T-hücre klonlarında bulunan M protein reaktivitesinin %62'sinin bulunduğu immünodominant bölge M5(81-103) dür (Guilherme ve ark., 2001). Bu bölgede 22 aminoasit bulunur ve kendi arasında 3 bölgeye ayrılır: M5(81-96), M5(83-103), M5(91-103). Bu ayrıcalıklı M5 epitopları periferik T-hücre klonları tarafından tanınır. Bu olay RKH'de otoimmün reaksiyonu başlatan streptokokkal bölgenin M5(81-103) olduğunu gösterir.

Yoshinaga ve arkadaşları, ARA hastalarının periferik kan lenfositleri ve kalp kapak boşluğundan aldıkları reaktif T-hücre klonlarıyla çalışmışlardır (Yoshinaga ve ark., 1995). Bu hücreler streptokokkal membran antijenini ve hücre duvarını tanısa bile M proteinini, miyozin veya hücre iskeleti proteinleri ile reaksiyona girmede başarısız olmaktadır. Hücrelerin M proteinine ve self antijene reaksiyon vermeme nedeninin, spesifik T-hücre yoğunluğunun düşüklüğüne bağlı olabileceği düşünülmüştür.

#### **1.1.8. Romatizmal Kalp Hastalığı ve TCR (T-hücre Reseptör)**

İnsan T-hücrelerinin reseptörleri  $\alpha\beta$  (alfa beta) ve  $\gamma\delta$  (gama delta) zincirlerinden oluşan heterodimer moleküldür. T-hücrelerinde en çok  $\alpha\beta$  heterodimer yapısı eksprese edilir. TCR  $\alpha$  zincirinde V(Variable), J(Joining) ve C(Constant) gen segmentleri bulunur.  $\beta$  zinciri ise çeşitli D gen segmentine sahiptir (Garcia ve ark., 1999). VDJ gen segmentlerinin karışımı  $10^{18}$  farklı TCR oluşumuna neden olur. TCR'deki bu bileşik bölgeler MHC peptidiyle ilişki kurarlar,  $\alpha$ - $\beta$  hiper variable düğümleri komplementer kararlı bölgeler (CDR1,CDR2,CDR3) olarak bilinir. Bu bölgeye bağlanan antijenlere süperantijenler (SAg) adı verilir. SAg'ler en güçlü T-hücre mitojenleridir. A grubu streptokokta birkaç süperantijen vardır. Bunlar streptokokkal pirojenik ekzotoksin (SPEs) A,C ve G-M ve SSA ve SMEZ 1 ve 2' dir. Süperantijenler, self antijenlere

karşı spesifik T-hücre popülasyonlarını aktive ederek ve büyümelerini sağlayarak yada T-hücre popülasyonlarını azaltarak otoimmün hastalıkların patogeneze katkıda bulunuyor olabilir (Proft, 2003).

Araştırmacılar S. pyogenes'in M proteininin SAg etkisini araştırmışlardır. Tomai ve arkadaşları, ARA hastalarında S. pyogenes'in M proteininin (pepM) pepsin enzimatik reaksiyonunun T-hücre popülasyonunun büyümesini sınırladığını bildirmişlerdir. Bu olay kronik RKH hastaların valvüler dokularında T-hücre aktivasyonunu sınırlamaktadır. RKH hastalarında valvüler sekelin inflamasyonla ilişkili olduğunu bu olayı lokal antijenler yada SAg'lerin başlattığını göstermişlerdir (Tomai ve ark., 1991).

#### **1.1.9. Romatizmal Kalp Hastalığında Sitokinler**

Sitokinler otoimmün hastalıklarda, etkin immün cevabı başlatan önemli ikincil sinyallerdir. ARA/ RKH hastalarında IL-2 yapımında artış rapor edilmiştir. Bu hastalarda CD4 ve CD25 T hücrelerinin fazlaca artması hastalığın aktif fazında periferik kanda aktif T hücrelerinin arttığının göstergesidir ( Morris ve ark., 1993).

Bazı araştırmacılar tarafından, ARA/RKH hastalarının plazmalarında TNF $\alpha$ 'nın arttığı (Narin ve ark., 1995; Yeğin ve ark., 1997) ve TNF- $\alpha$ 'nın RKH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Brand ve ark., 2005).

RKH'nin akut fazındaki kalp lezyonlarında Aschoff nodüllerinin, IL-1 ve TNF $\alpha$  , IL-2 sitokinlerinin yapımı ile ilişkisi bulunmuştur. (Fraser ve ark., 1997).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ARA/RKH hastaların kalp lezyonlarındaki mononükleer hücrelerinden, fazla miktarda; interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ve TNF $\alpha$ 'nın salındığı gösterilmiştir (Guilherme ve ark., 2004). Ayrıca düşük seviyedeki IL-4 yapımının valvüler RKH lezyonlarının ilerlemesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar streptokokkal M5 antijeniyle uyarılmış T hücrelerinin

%85'inin IFN- $\gamma$  ürettiğini göstermişlerdir (Guilherme ve ark., 2004).

### 1.1.10. Akut Romatizmal Ateş (ARA) Tanısı

ARA'nın tanısı modifiye edilmiş *Jones kriterlerine* göre yapılmaktadır. İki majör veya bir majör, iki minör bulgu ile birlikte geçirilmiş streptokok enfeksiyonunun kanıtlarının (boğaz kültürü, kızıl, artmış ASO titresini) bulunması tanı koymada yeterlidir.

Tanı kriterleri 3 gruptan oluşmaktadır:

#### 1. Majör Belirtiler:

- a. Artrit
- b. Kardit
- c. Subkütan nodüller
- d. Eritema Marginatum
- e. Sydenham Koresi

#### 2. Minör Belirtiler:

- f. Klinik Bulgular
  - i. Artralji
  - ii. Ateş
- g. Laboratuvar Bulguları
  - i. Akut faz reaktanların yüksekliği
  - ii. EKG'de PR mesafesinin uzaması

#### 3. Yakın Zamanda Geçirilmiş Grup A Beta Hemolitik Streptokok Enfeksiyon Bulgusu

### Majör Belirtiler:

**Artrit (Eklem İltihabı) :** ARA'nın en sık rastlanan belirtisidir (%70). "Gezici artrit" birçok eklemi etkileyebilir. Genellikle büyük eklemleri (diz, ayak bileği, dirsek, el bileği) tutar. Gezici tarzda ve birden fazla eklemi tutması en önemli özelliğidir.

İltihabın bir eklemiden diğerine geçmesi, tutulan bir eklem düzelirken başka bir ekleminde iltihap ortaya çıkması gezici özelliği gösterir. Sekel bırakmaz. Eller ve boyun eklemleri daha seyrek etkilenir. Eklemde şişlik, şiddetli ağrı, kızarıklık, ısı artımı, hassasiyet ve hareket kısıtlılığı olur. Şişlik belirgin olmasa da, eklem ağrısı şiddetli olabilir.

**Kardit:** Kalp katmanlarının iltihabı anlamına gelir. Hastaların %45-50'sinde görülen ve hastalığın seyrini belirleyen majör bulgudur. Kalbin tüm tabakalarını (endokard, miyokard ve perikard) tutabilir (pankardit). Endokardiyal yapılar tutulmadan perikard ya da miyokard tutulmaz (Narula ve ark., 1999). Endokard tutulumu kapak yetersizlikleri ile kendini gösterir. Akut hastalık sırasında yetersizlik görülürken ilerleyen yıllarda fibrozis nedeniyle kapaklarda stenozlar ortaya çıkar. En sık tutulan kapak mitral kapaktır. İkinci sıklıkta aort kapağı tutulur. Aort kapağı, erkeklerde kızlara oranla daha sık tutulur. Triküspit ve pulmoner kapaklar daha nadir olarak etkilenirler (Galal ve ark., 1998; Ayoub ve ark., 2001).

**Subkütan Nodüller:** ARA vakalarının %2-10'unda görülür. Tekrarlayıcı özelliği vardır. Sert, ağrısız, kaşıntısız, cilde yapışık olmayan ve rahatça oynayan 0,2-2 cm çapında deri altı şişliklerdir. Küçük ve büyük eklemlerin ekstansör yüzlerinde, saçlı deride ve spinal çıkıntılar boyunca tek veya gruplar halinde yer alırlar. Hemen kaybolmazlar, haftalarca durabilirler. Karditli hastalarda daha sık gözlenirler (Writing Group ... , 1992).

**Eritema Marginatum:** ARA seyri sırasında ortaya çıkan gövde ve ekstremitelerin proksimal kısımlarında yerleşmiş büyük maküler lezyonlardır. Hastaların %55'inde görülür. Karditli hastalarda daha sık ortaya çıkar. Kaşıntısız-kenarları dantel ya da harita şeklinde girintili çıkıntılı-koyu pembe renkte ortası soluk basmakla solmayan cilt döküntüleridir. Isı ve basınç uygulaması ile yeni lezyonlar ortaya çıkabilir. (Galal, 1998, Writing Group ... , 1992).

**Sydenham Koresi:** Bazal gangliyonların özellikle kaudat çekirdeğin tutulumu sonucu

istem dışı hareketler ortaya çıkar. Eski Yunancada dans anlamına gelen bir kelimedir. Hastaların yaklaşık %10-30'unda görülür. İlk bulgular el yazısında bozulma, giyinme ve kendi ihtiyaçlarını karşılamada güçlütür. Hatta amaçsız hareketler yüzünden yürüme ve beslenmede problemler görülebilir. Hareketler bilinçli olarak kısa süreler için azaltılabilir, uykuda kaybolabilir ya da stres ve yorgunlukla artabilir. Okul ortamında konsantrasyon kaybı ve endişe nedeniyle okul başarısına etki eder. Hafifse davranış bozukluğu olarak değerlendirilebilir. İki- üç ay içinde kendiliğinden geçer ve destekleyici tedavi ve takip gerektirir ( Vegasy, 2005; Writing Group ... , 1992 ).

### **Minör Belirtiler:**

#### **a) Klinik Bulgular:**

- i. Artralji: Artrit olmaksızın mevcut olan eklem ağrısıdır.
- ii. Ateş: Tedavi edilmemiş ARA vakalarının erken devresinde görülür ve 38.8<sup>0</sup> C'ye kadar çıkabilir.

#### **b) Laboratuvar Bulguları:**

- i. Akut faz reaktanlarının yüksekliği: Eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif proteinin (CRP) yüksekliği inflamasyonu gösterir.
- ii. EKG'de PR mesafesinin uzaması: ARA'nın özgül bir bulgusu değildir, karditi göstermez (Writing Group... , 1992).

### **Yakın Zamanda Geçirilmiş Grup A Beta Hemolitik Streptokok Enfeksiyon Bulgusu**

Boğaz kültüründe veya hızlı antijen tespit yöntemi ile grup A Beta Hemolitik streptokok varlığını göstermek:

Laboratuvar bulgusu ile desteklenmeyen boğaz ağrısı veya kızıl öyküsü yakın zamanda geçirilmiş grup A beta hemolitik streptokok enfeksiyon göstergesi değildir. Boğaz kültüründe veya hızlı antijen tespitine yarayan yöntemlerle grup A beta hemolitik streptokokun gösterilmesi, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyonla kronik

taşıyıcıyı ayırt edemediği için, çok güvenilir değildir. Hızlı antijen tespit testleri çok özgül olmasına rağmen, hassas değildir. Negatif sonuçların varlığında mutlaka boğaz kültürü alınmalıdır.

Yüksek titreli veya titresini yükselen streptokokkal antikorlar, Streptokokkal antikor testleri; (ASO: Antistreptolizin-O) yakın zamanda geçirilmiş grup A streptokok enfeksiyonları gösterme açısından en uygun yöntemdir. ARA'nın klinik bulgularının başlaması ile streptokokkal antikor yanıtının en üst düzeye çıkması aynı zamanlara rastlar.

ARA vakalarının %80'inde ASO yükselmiştir. %20 vakada normaldir. Kore vakalarında %67 oranında ASO titresinde yükselme tespit edilir. Çocuklarda 333 Todd ünitesi yüksek kabul edilir. ASO'nun başlangıçta yükselmemiş olması ARA tanısından uzaklaştırmaz. Diğer streptokok antikor yanıtlarına (antideoxyribonuclease B, antistreptokinase ve antihyaluronidase) da bakılırsa ARA vakalarının %95'inde pozitif olduğu görülür (Galal ve ark., 1998).

#### **1.1.11. Romatizmal Kalp Hastalığı ile İlişkili Genetik Çalışmalar**

Bir akut faz protein olan Mannan Bağlayan Lektin (Mannan Binding Lectin =MBL) gen polimorfizmi 107 RKH hastasında incelenmiş ve A/A genotipi anlamlı yüksek bulunmuştur. Sağlıklı grupta ise çok düşük bulunmuştur. RKH ile MBL genindeki polimorfizmin hastalığa yatkınlıkta rol oynadığı gösterilmiştir (Messias ve ark., 2006).

Türkiye'de yapılan çalışmalardan TNF $\alpha$  gen polimorfizmi (Berdali ve ark., 2006) ve innat immün sistemde patojenlerin tanınmasını sağlayan Toll-like reseptörlerden TLR-2 polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki saptanmamıştır (Düzgün ve ark., 2007).

İmmün cevabın baskılanmasında rol oynayan CTLA-4 molekülünün polimorfizmi araştırılmıştır. CTLA-4 exon\_1 +49 G/G fenotipi RKH hastalarında

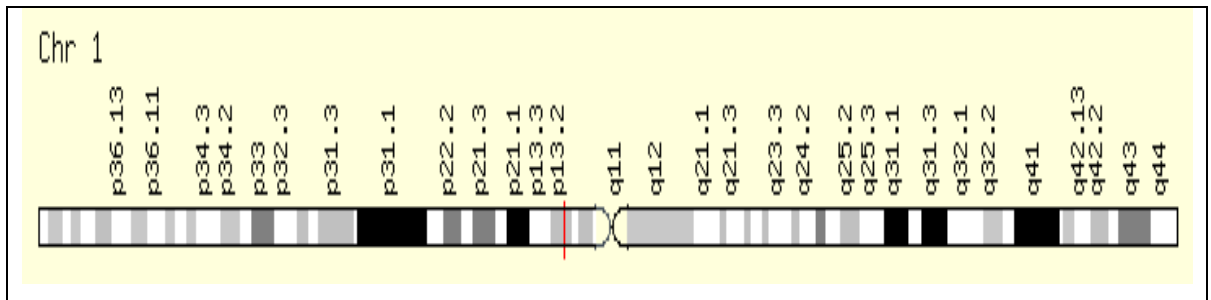
kontrollere göre artmış sıklıkta bulunmuştur.(OR:3.11 P=0,016) Bu sonuç CTLA-4 exon\_1 +49 G/G gen polimorfizminin RKH’da yatkinlık yaratan faktörler arasında olduğunu düşündürebilir (Düzgün ve ark., 2009).

## 1.2. PROTEİN TİROZİN FOSFATAZ NON RESEPTÖR 22 (PTPN 22)



Şekil 1.3- PTPN22 Geni ([www.thesgc.org/structures/structure\\_description/2P6X/](http://www.thesgc.org/structures/structure_description/2P6X/))

### 1.2.1. PTPN 22 Geni



Şekil 1.4 - PTPN22 Gen Lokasyonu  
([www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Ptpn22](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Ptpn22))

PTPN22 geni 1. kromozomunun kısa kolunda (1p13,2) bulunur. (Şekil 1.4) 57,898 baz uzunluğundadır ve 807 aminoasit kodlar. PTPN22 geninde kodlanan proteinlerin molekül ağırlığı 91,705 Dalton'dur (Şekil 1.3). PTPN22 geninde 24 exon 21 transcript çeşidi vardır. PTPN22 geninden 10 farklı protein sentezlenir. Bu proteinler sitoplazma da yer alırlar.

Protein tirozin fosfat, lenfoid dokuda gen ifadelenir. Bu enzim bir moleküler adaptör protein olan CBL (Casitas B-lineage lymphoma) ile ilişkilidir. CBL'nin T hücre sinyal yolunda T hücrelerinin aktivasyonunu negatif yönde düzenleyici etkisi vardır. ( Bottini ve ark., 2004 )

Tüm protein tirozin fosfatazlar (PTP), yaklaşık 200-300 aminoasitlik katalitik bir domain içerirler. PTP membrana bağlı reseptörler ya da sitoplazmik fosfataz olarak bölünmüşlerdir. Hücre içi konumları; katalitik bölgenin dışında, aminoasit dizilerine bağlı sitoplazmik fosfatazdır. PTPN22 bir lenfoid hücre içi fosfatazdır (Cohen ve ark., 1999).

PTPN 22 geninin en yaygın polimorfizmi R620W (rs2476601) 620. kodonun 1858. pozisyonundaki C/T arjinin/triptofan değişikliğinin olduğu bölgededir. Bu değişiklik LYP(Lenfoid Tirozin Fosfataz), Csk kinaz ilişkisini bozar böylece T hücre aktivasyonu artar. Bu olay otoimmün hastalıklara yatkınlığı artırır. PTPN 22 geninin birçok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları; Tip I diyabetes mellitus, romatoid artrit, SLE, Graves, Addison hastalığıdır.

### 1.2.2. PTPN 22 Geninin Klonlaması

Hematopoetik hücre içi protein tirozin fosfatazın 2 murin cDNA'sı vardır. (Matthews ve ark., 1992). Bu murin cDNA'lardan biri PTPN6 diğeri PTPN8'dir. Pep diye adlandırılırlar. Pep 500 aminoasitlik büyük bir C terminal domain içerir. Bu da zengin PEST (Proline, Glutamic acid, Serine, and Threonine) motifleri içerir. Bu tip domainler hızla bozulan karakteristik proteinlerdir. Pep cDNA'sı PCR tekniği ile fare beyni ve dalağından bilinen fosfataz dizilerinin mRNA primer dizimleri kullanılarak

izole edilir. Bu yapılan PCR'lar klonlanır. İzole edilmiş uzun cDNA'lar 702/3 pre-B-cell cDNA kütüphanelerinde tanımlanır.

Pep'in, 802 aminoasitlik molekül ağırlığı 89,7 kd olan, 2,7-kb cDNA'sı bulunmuştur. Aminoasit dizilerinin fosfataz domainlerinin, yaklaşık %35'i diğer protein tirozin fosfatazların fosfataz domainleriyle benzerdir. Pep mRNA'sı en çok dalak ve timustan, daha az lenf nodları ve kemik iliğinden Northern blot yöntemiyle elde edilir. Pep proteinin invitro ve bakteriden gen ifadelenir. PTP aktivitesi gösterilmiştir.

PTP katalitik domainlerinin PCR görüntüleri insan timosit cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır. Cohen ve arkadaşlarının 1999'da yaptığı çalışmada PTPN8'in cDNA'sının şifrelediği iki izoform bulunmuştur (Cohen ve ark., 1999). LYP1 VE LYP2 Lenfoid tirozin fosfataz diye adlandırılırlar. Fare Pep proteininde, 808 aminoasitlik LYP1 proteini %70'den daha fazla oranda bulunmuştur. LYP1 katalitik domain N-terminal ucu içerir fakat hidrofobik dizisi yoktur. Bu da onun bir non-reseptör fosfataz olduğunu gösterir.

LYP2'nin 692 aminoasiti vardır. Northern blot yöntemiyle 4,4 kb LYP1 transkripti tüm lenfoid dokuda gen ifadelenir. Fakat diğer dokularda gen ifadelenemez. LYP2 5,2 kb transcripti lenfoid dokudan gen ifadelenir. En fazla fetal karaciğerden elde edilir. LYP1 immunpresipitasyon gen ifadelenemez, immünblot analizlerinde ise 105 ve 85 kD'lik protein olarak LYP1 ve LYP2 gen ifadelendiği gösterilmiştir. İmmünfloresans mikroskopta bu iki proteinin de sitoplazmik olduğu ispatlanmıştır. İmmünblot analizinde LYP1'in T ve B hücrelerinde gen ifadelendiği gösterilmiştir.

### **1.2.3. PTPN 22 Geninin Fonksiyonları**

Cloutier ve Veilette 1996 yaptıkları bir çalışmada PTPN22 geninin Tirozin kinaz Csk ile ilişkisini tanımlamışlardır. Src homolog-3 (SHB) domainli Csk'nın prolinden zengin bölgesi Pep ile ilişkili olduğunu Pep'in Csk'nın T-hücre ve diğer hematopoetik hücreleri etkilediği ve düzenlediğini göstermişlerdir ( Cloutier, 1996).

1999 yılında Cohen ve arkadaşları, LYP'nin fosfataz aktivitesini ispatladılar. 116 kD proteinlik CBL'nin LYP ile ilişkili olduğunu, LYP'nin fazla gen ifadenmesinin CBL'nin fosforilasyonunu azalttığını, CBL'nin T-hücre sinyal yolunda T-hücrelerinin aktivasyonunu negatif yönde etkilediğini göstermişlerdir (Cohen ve ark., 1999).

Hill ve arkadaşları 2002 yılında, LYP'nin fazla gen ifadenmesinin, T-hücre sinyal yolunda, T-hücre reseptör antikorları ve CD28 kostimülatör molekülünün, transkripsiyonel aktivitesinin başlatılmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir (Hill ve ark., 2002).

2007 yılında Yu ve arkadaşları, LYP aktivitesine karşı bir inhibitör (I-C11) tanımlamışlardır. Protein kinaz C LYP'yi fosforilize eder. Bu fosforilizasyon I-C11'in LYP'nin aktivitesini bozması ile bozulur. Bu da Src ailesi kinazların aktivitesini bozar ve T-hücre reseptör sinyalinin regülasyonu bozulur. (Yu ve ark., 2007)

Vang ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada PTPN22 genindeki R620W polimorfizminin, arjinin/triptofan değişikliğine neden olduğunu, Prolinden zengin bölgesi LYP; (Pep)'in protein protein etkileşimleri, tirozin kinaz Csk ve T-hücre aktivasyonunu etkilediğini. PTPN22 geni varyant allelinin, timik seleksiyonun başlangıcında bir değişiklik yaptığını göstermişlerdir. Bunun sonucunda otoreaktif T-hücreleri artar. Bunlar negatif seleksiyondan kaçarak ve otoimmüniteyi başlatırlar. (Vang ve ark., 2005)

#### **1.2.4. PTPN 22 Geninin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi**

Yapılan çalışmalar PTPN22 geninin pek çok otoimmün hastalıkla ilişkisi olduğunu göstermektedir.

Begovich ve arkadaşları 2004 yılında sistemik otoimmün bir hastalık olan romatoid artrit PTPN22 R620W polimorfizmiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Genel popülasyonda beyaz ırkın %17'sinin risk allellerini taşıdığı ve romatoid aritli

hastaların %28'inde risk allellerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (Begovich ve ark., 2004).

Carlton ve arkadaşları 2005 yılında 475 romatoid artritli, 475 kontrol hastasında PTPN22 geninin diğer genetik varyantlarını çalışmışlardır. Analiz sonuçları 10 yaygın PTPN22 haplotipinin Kuzey Amerikalı beyazlarda bulunduğunu göstermiştir. Yapılan analizlerde R620W polimorfizminden bağımsız, romatoid artrit ile ilişkili tek yaygın haplotip bulmuşlardır (Carlton ve ark., 2005). Kallberg ve arkadaşları 2007 yılında romatoid artrit'de 2 majör genetik risk faktörünü HLA-DRB1 allelleri ve PTPN22 R620W allelini karşılaştırmışlardır. 3 büyük kontrol grubunda İsveçli, Kuzey Amerikalı, Alman 1977 hasta ve 2405 kontrol grubuyla çalışılmış, 3 grupta da HLA-DRB1 allelleri ve PTPN22 R620W allelinin romatoid artrit oluşumuna katkıda bulunduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca bu hastaların sigara kullanmalarıyla PTPN22 R620W arasında bir ilişki bulunamamıştır (Kallberg ve ark., 2007). Şahin ve arkadaşları 2009 yılında Türkiye'de 167 romatoid artritli hasta, 177 kontrol grubunda çalışmış, PTPN22 R620W polimorfizmi ile romatoid artrit hastalığı arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir.(OR:1,3 P:0,55) (Şahin ve ark., 2009)

Bottini ve arkadaşları 2004 yılında PTPN22 geninin R620W polimorfizminin insülin bağımlı diabetes mellitus hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Bottini ve ark., 2004 ). Kawasaki ve arkadaşları 2006 yılında 1698 Asyalı bireyle, 738'si Tip I diabetes mellitus'lu ve 141'i otoimmün tiroitli hastada PTPN22 gen polimorfizmini wild tip homozigot 1858 C/C genotipi olarak saptamışlardır. PTPN22 geninde promotor bölge tanımlanmıştır.Bu promotor bölgenin -1123 C/G (rs2488457) polimorfizmi ile Japon ve Koreli Tip I diabetes mellitus hastaları arasında dikkate değer bir ilişki gösterilmiştir (Kawasaki ve ark., 2006) .

PTPN22 1858 C/T gen poliforfizminin Graves tiroiditi ve otoimmün Addison hastalığı ile ilişkisi rapor edilmiştir (Smyth ve ark., 2004; Skinningsrud ve ark., 2008) .Velaga ve arkadaşları 2004 yılında İngiliz ve Polonyalı Beyazlarda PTPN22 geni R620W polimorfizminin otoimmün bir hastalık olan Graves ile ilişkisini göstermişlerdir ( Velaga ve ark., 2004).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın amacı romatizmal kalp hastalığı gelişmesinde genetik yatkınlık açısından PTPN22 geni R620W polimorfizminin katkısının olup olmadığını göstermektir.

### 2.1. Hasta Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim Dalı, Kardiyoloji, Kardiyovasküler Cerrahi ve Romatoloji Polikliniklerine başvuran daha önceden Jones kriterlerine göre tanı almış veya yeni tanı alan 121 RKH'lı erişkin hastadan ve sağlıklı kontrol grubu olarak ARA veya otoimmün hastalık öyküsü olmayan 160 erişkin bireyden EDTA'lı tüpe 4,5ml. periferik venöz kan alındı. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar +4 derecede saklandı. Bazı kan örnekleri alındığı gün, diğerleri 2006-2009 yılları arasında toplanmış kan örneklerinden çalışıldı. Hasta ve kontrol grubundan bilgilendirilmiş onamları alındı.

### 2.2. PTPN 22 R620W Gen Polimorfizminin Belirlenmesi

PTPN22 genindeki R620W polimorfizmini incelemek için hastalardan ve sağlıklı kontrollerden elde edilen DNA'lar Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) /kesim parçacıkları uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle incelendi. PTPN22 geninin 4. exonunda tanımlanan Arginin Triptofan değişiminin olduğu 1858 C/T polimorfizmi, yapılan son çalışmalarda (rs2476601, G/A) olarakta gösterilmektedir. Belirtilen değişimi incelemek için özgül primerler kullanılarak PCR tekniği ile ilgili bölge amplifiye edildi. PCR ile çoğaltılan DNA'larda XcmI restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle genotiplendirme yapıldı.

### 2.3. DNA'nın Elde Edilmesi

DNA örnekleri %10'luk EDTA'lı tüplere alınmış olan yaklaşık 4,5 ml periferik venöz kandan Norgen Biotek genomik DNA purifikasyon kit kullanılarak elde edildi (Norgen Biotek - Kanada). Elde edilen DNA, moleküler teknikler için kullanılmaya hazır durumda idi.

#### Gerekli Malzemeler:

- ▶ DNA izolasyon kiti ( Invisorb Genomik DNA - Almanya)
- ▶ Mikrosantrifüj
- ▶ Termomikser (56<sup>0</sup>C için ısı bloğu)
- ▶ Ölçüm silindiri (250 ml)
- ▶ Tek kullanımlık eldiven
- ▶ Pipet ve pipet ucu
- ▶ Vorteks
- ▶ Reaksiyon tüpü (1,5 ml veya 2ml )
- ▶ Distile su
- ▶ 96-100 % etanol

#### DNA'nın İzolasyonu:

- ▶ Çalışılacak hasta sayısı kadar 1,5 ya da 2 ml'lik reaksiyon tüpü (eppendorf) hazırlanır.
- ▶ Hazırlanan reaksiyon tüplerinin üzerine hasta isimleri, hasta numaraları, tarih yazılır. Isı bloğu 56<sup>0</sup>C ' ye getirilir.
- ▶ Proteinaz K, -20<sup>0</sup>C'den oda ısısına gelmesi için çıkarılır.
- ▶ Hasta sayısı X 200 mikrolitre Elution buffer hazırlanır. 56<sup>0</sup>C ısı bloğuna yerleştirilir
- ▶ 200 mikrolitre kan reaksiyon tüpüne konur.
- ▶ Üzerine 200 mikrolitre Lysis Buffer A konur.
- ▶ Oda ısısına gelen proteinaz K 'dan 20 mikrolitre reaksiyon tüpüne pipetlenir. Yukarı aşağı sallanarak ya da vorteksenerek 5 saniye karıştırılır.

- ▶ Reaksiyon tüpleri 56 °C ısı bloğuna yerleştirilir.
- ▶ 15 dakika bekletilir. 2 ya da 3 kez vorteksenerek karıştırılır.
- ▶ Filtreli reaksiyon tüpleri hazırlanır. Üzerlerine isimleri yazılır.
- ▶ 15 dakika sonunda reaksiyon tüpleri ısı bloğundan alınır.
- ▶ Üzerlerine 400 mikrolitre Binding Buffer eklenir.
- ▶ 4-5 kez pipetleme yapılır ya da vorteksenir.
- ▶ Reaksiyon tüplerinden 800 mikrolitre karışım alınarak filtreli reaksiyon tüplerine konur.
- ▶ 1 dakika inkübe edilir.
- ▶ 2 dakika 13.000 x g'de santrifüj edilir.
- ▶ Santrifüj sonrasında filtreler alınarak yeni bir reaksiyon tüpüne yerleştirilir.
- ▶ Üzerlerine 500 mikrolitre Wash Buffer I konur.
- ▶ 1 dakika 13.000 x g'de santrifüj edilir.
- ▶ Üzerlerine 800 mikrolitre Wash Buffer II konur.
- ▶ 1 dakika 13.000 x g'de santrifüj edilir.
- ▶ Reaksiyon tüpünün altındaki sıvı dökülerek filtreler tekrar reaksiyon tüpüne yerleştirilir.
- ▶ 5 dakika 13.000 x g'de santrifüj edilir.
- ▶ Santrifüjden sonra filtreler; DNA'nın saklanacağı, üzerlerinde tarih, isim, numara yazan reaksiyon tüplerine aktarılır.
- ▶ Filtrenin üzerine 200 mikrolitre Elution Buffer eklenir.
- ▶ 1 dakika oda ısısında inkübe edilir.
- ▶ 2 dakika 13.000 x g'de santrifüj edilir.
- ▶ Reaksiyon tüplerinin üzerindeki filtreler atılır.

Hasta ve sağlıklı bireylerden elde edilen DNA'lar %1,5 luk agaroz jele yüklenerek 150V'da yaklaşık 15 dakika elektroforeze tabi tutulur. Ultraviyole ışık altında DNA bantları değerlendirilir. Elde ettiğimiz DNA'lar -20°C'de çalışma zamanına kadar saklanır.

## 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR bir çeşit invitro klonlama yöntemidir. Temel olarak DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıklarda birbirinden ayrılması (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin (primerler) hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon) ; sonra da zincirin uzaması (polimerizasyon) aşamalarından oluşur. Bu basamakların ard arda belirli sayıda yinelenmesiyle hedef DNA her döngüde yaklaşık 2 katına çıkar. Bir PCR işleminde 35 döngü sonunda DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık  $2^{35}$  kez çoğaltılmış olur. PCR aşamalarında her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Denatürasyon 94-98°C arasında, hibridizasyon 37-65°C arasında polimerizasyon ise 72°C de gerçekleşir.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanışı:

- ▶ DNA örneği: Yaklaşık 5µg genomik DNA
- ▶ Çoğaltılacak bölgeyi çevreleyen primer çifti; genellikle 18-20 nükleotid uzunluğunda olurlar ve kalıp DNA'ya sağdan ve soldan bağlanarak DNA polimerazın senteze başlaması için gerekli serbest 3' ucunu sağlarlar. Son konsantrasyonları 1µM olmalıdır.
- ▶ dNTP'ler; son konsantrasyonları 2µM olacak şekilde ortamda bulunması gereken dTTP, dCTP, dATP, dGTP bazlarıdır.
- ▶ Isıya dayanıklı DNA-polimeraz enzimi; *Thermus aquaticus*'dan elde edilen termostabil DNA Polimeraz uygulanır.
- ▶ Uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı, kullanılan polimeraz enzimiyle birlikte sağlanır. (Qiagen Buffer TBE - Hollanda) İçeriği 500µM KCL, 100µM Tris-HCL ve 15µM MgCl<sub>2</sub> 'den oluşur.
- ▶ Distile su.

Yukarıda sıralanan maddeler aynı tüpün içine konularak, sıcaklık devirleri sağlayan thermal cycle aletinde (Perkin Elmer - ABD) PCR işlemi gerçekleştirilir.

Bu çalışmada PTPN22 R620W (G/A) polimorfizmini belirlemek için kullanılan primer çiftleri ve PCR koşulları aşağıda verilmiştir. (Şekil 2.1)

Forward 5'- AAT GTT GCT TCA ACG GAA TTT- 3'

Reverse 5'- GGC CTC AAT GAA CTC CTC AA- 3'

(Metabion International AG - Almanya)

AATGAACAAGTGTCAACTTTACTGATA**AATGTTGCTTCAACGGAATTTAA**  
 ATATAAATTATGGTAAATTTATATTTAATATTAGAATATAAGAATTTC  
 CTTTGGATTGTTCTAATTAACAATTGTTACAATATTTTTGACATTTTG  
 GATAGCAACTGCTCCAAGGATAGATGATGAAATCCCCCTCCACTTC  
 CTGTACGGACACCTGAATCATTTATTGTGGTTGAGGAAGCTGGTGAG  
 TACAGTTCAGTAAGTATAAAATAAAGTGTGGGATGGGCATGGTGGCT  
 CATGCCTTTAATTCCAGCACTTTGGGAAGCTGATGTGTGAGCCTTGA  
**GTTTGAGGAGTTCATTGAGGCC**AGGAGTTCAAGACTAGCCTGCGCAAC  
 ATAGTGAGACCTCATCTCTAATTTTTTTTTTTAATTTA

**Şekil 2.1** – PTPN22 geninin 4. ekzonunun baz dizisi. Koyu olarak gösterilen PCR ile çoğaltılan bölgedir. Altı çizili olarak belirtilen yerler ise primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Çalışmamızda yukarıdaki dizileri belirtilmiş primer çiftleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonları için dTTP, dCTP, dATP, dGTP bazlarının (Fermentas - Litvanya) son konsantrasyonları 2µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Taq DNA polimeraz (Fermentas - Litvanya) bütün PCR reaksiyonları için bir ünite kullanılmıştır. Primerlerin son konsantrasyonları 0,6µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Son hacim 25µl olacak şekilde, tampon ve distile su eklenerek PCR tüpleri ile ısı döngüsü aletine konulmuştur.

Bütün PCR reaksiyonlarında 94<sup>0</sup>C'de 5dk başlangıç denatürasyonu ve 72<sup>0</sup>C 'de 7dk'lık bir son uzama gerçekleştirilmiştir. PTPN22 R620W (rs2476601, G/A) polimorfizmini saptamak için gerçekleştirilen PCR sıcaklıkları 94<sup>0</sup>C'de 50 sn, 55<sup>0</sup>C'de 50 sn, 72<sup>0</sup>C'de 50 sn olmak üzere 35 döngü olarak belirlenmiştir.

## 2.5. Kesim Parçacıkları Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, spesifik dizileri tanıyarak çift iplikçikli DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağlarını keserek DNA'yı iki ayrı parçaya ayırır. RFLP, DNA üzerindeki polimorfizmlerin herhangi bir restriksiyon endonükleaz için kesim noktasını ortadan kaldırması ya da herhangi bir restriksiyon endonükleaz için kesim noktası yaratmasına dayanarak oluşan uzunluk farklarına göre nükleotid değişikliklerini saptamaya yarayan bir yöntemdir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen enzimle kesim analizleri için reaksiyon tüpü başına 10 ünite enzim kullanılmıştır. PCR ürünleriyle enzimlerin 37°C'de reaksiyon süreleri 12-16 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık derecesi ve enzimin tanıma dizisi verilmiştir. (Şekil 2.2)

XcmI (New England Biolab - USA)

Tanıdığı dizi ;

5'...CCANNNNN NNNNTGG...3'  
3'...GGTNNNN NNNNNACC...5'

aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 37°C

AATGAACAAGTGTCAACTTTACTGATAATGTTGCTTCAACGGAATTTAAATAT  
AAATTATGGTAAATTTATATTTAATATTAGAATATAAGAATTTCCTTTGGATT  
GTTCTAATTAACAATTGTTACAATATTTTGGACATTTTGGATAGCAACTGCT  
CCAAGGATAGATGATGAAATCCCCCCTCCACTTCCTGTA C(T)GGACACCTGA  
ATCATTTATTGTGGTTGAGGAAGCTGGTGAGTACAGTTCAGTAAGTATAAA  
ATAAAGTGTGGGATGGGCATGGTGGCTCATGCCTTTAATTCCAGCACTTTG  
GGAAGCTGATGTGTGAGCCTTGAGTTTGAGGAGTTCATTGAGGCCAGGAGT  
TCAAGACTAGCCTGCGCAACATAGTGAGACCTCATCTCTAATTTTTTTTTTTTAAAT  
TTA

**Şekil 2.2** - XcmI restriksiyon enziminin tanıdığı dizi. Kesim bölgesi italik olarak gösterilmiştir.

PTPN22 R620W polimorfizmini tayin etmek için PCR yöntemini kullanarak çoğaltılmış 329 baz çiftlik bölge XcmI restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. 1858. pozisyonda A nükleotidini taşıyan bireylerde (620W) 163 ve 166 baz çiftlik 2 bant oluşması beklenmektedir fakat bantların büyüklüklerinden dolayı jelde tek bant görülecektir. **R620W G/G** homozigot durumunda enzim DNA üzerinde kesim noktası olmadığı için PCR ürününü kesememekte ve enzimle muamele edilmemiş örnek ile aynı büyüklükte tek bir bant olarak görülecektir. Örneklerin **R620W G/A** heterozigot olduğu durumlarda PCR ürünü kısmen kesilmekte dolayısıyla jelde kesilmiş ve kesilmemiş olmak üzere 2 bant görülmesi beklenmektedir.

PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak elde edilen ürünler *Agaroz jel elektroforezi* yapılarak incelenmiştir.

## 2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Lonza - ABD) incelenecek olan bantların büyüklüğüne göre (ağırlık/hacim oranına göre ) hazırlanır. Mikrodalga fırında (Regal - Türkiye) eritilecek jel tabağına (Owl Scientific - ABD) dökülür. Örnekler, yüklendikten sonra elektrik akımı altında yürütülerek, ultraviyole ışık altında (Spectroline - ABD) DNA'ya bağlanan etidyum bromidin parlamasıyla incelenir. Sonuçlar bir kamera yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılarak (Wealtech Olphin - ABD) fotoğrafları alınır.

### *Agaroz Jel Hazırlanması:*

- Gerekli miktarda agaroz tartılır, erlene mayere koyulur.

#### **Malzemeler (%3 lük 150 mL)**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Agaroz                          | 4,5 g  |
| Tris-Borikasıit-EDTA (TBE) 0,1X | 150 ml |
| EtidiumBromide (EtBr)           | 5 µl   |

- Gerekli miktarda TBE eklenir.

- ▶ Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur.
- ▶ Mikrodalga fırın, örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılır.
- ▶ Aralıklarla erlen mayer mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanır.
- ▶ Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürülür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılır.
- ▶ EtBr eklenir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanır.
- ▶ Jel tabağının çatlamaması için çözelti muslukta biraz soğutulur.
- ▶ Jel yavaşça tabağa dökülür ve polimerize olması için en az 15 dakika beklenir.

#### ***Örneklerin Jele Yüklenmesi:***

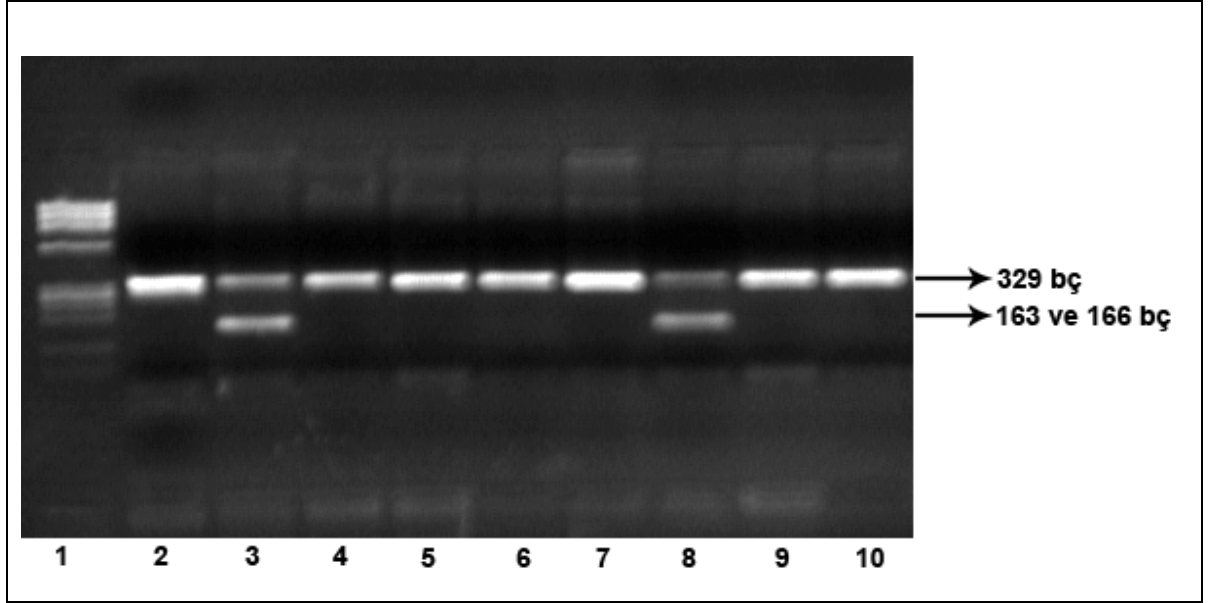
- ▶ Jel tanka yerleştirilir.
- ▶ Tank jelin üstünü kapatacak kadar TBE ile doldurulur.

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>Örnek Yükleme Tamponu</b> | 6X, 100mL |
| <b>Bromfenol Mavisi</b>      | 0,25 g    |
| <b>Ksilen Siyanol FF</b>     | 0,25 g    |
| <b>Gliserol</b>              | 30 ml     |

Distile Su ile 100 ml'ye tamamlanır.

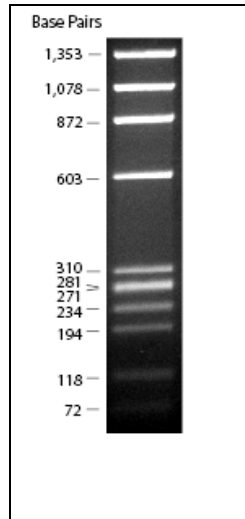
- ▶ Yüklenecek örnek sayısı kadar 6X yükleme tamponu (yaklaşık 1'er µl) parafilm üstüne koyulur.
- ▶ 5 µl PCR ürünü yükleme tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklenir.
- ▶ Bir kuyucuğa da marker koyulur.
- ▶ 150 V da 20 dakika yürütülür.

PTPN22 genindeki R620W polimorfizmini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz PCR ürünlerinin enzim ile kesim sonrası agaroz jel elektroforezi *Şekil 2.3'* de görülmektedir.



**Şekil 2.3** - PTPN22 geni R620W polimorfizminin XcmI Enzimi ile kesimi sonrası %2,5'luk agaroz jelde elektroforez görünümü

- 1 :  $\Phi$  x 174 DNA / BsuRI (Hae III ) Büyüklük marker'ı (Şekil 2.4)  
 2 : Kesilmemiş PCR ürünü  
 3 ve 8 : Heterozigot G/A hasta örnekleri  
 4,5,6,7,9,10 : Homozigot G/G hasta örnekleri



**Şekil 2.4** -  $\Phi$ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, % 1,7 Agaroz Jel

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3026.asp>

## 2.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada polimorfizmler, genotip dağılımları ve allel sıklıkları hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılmıştır. Veriler, Binary Logistic Regression modeli kullanılarak Minitab14 bilgisayar programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Odds Ratio olarak ifade edilmiş güven aralığı (CI) %95 güvenilirlik düzeyinde hesaplanmıştır.

### 3. BULGULAR

Çalışmaya katılan 121 RKH hastasının yaşı 18-65, yaş ortalaması  $\pm$  SD: 35,9  $\pm$  19,0 arasındadır. 78'i kadın 43'ü erkektir. Geçirilmiş ARA tanısı Jones Kriterlerine göre yapılmış olup, kalp kapak hastalığı olanlar hastanemiz Kardiyoloji, Kardiyovasküler Cerrahi, İç Hastalıkları ve Romatoloji polikliniklerinde takip edilirken bu çalışmaya alınmıştır. Kalp kapak lezyonlarına göre hastaların dağılımı; 71 mitral darlık, 10 mitral darlık ve mitral yetmezlik, 31 mitral ve aort lezyonu, 6 mitral, aort ve triküspit lezyonu, 3 aort darlığı şeklindedir. Çalışmaya katılan 160 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu yaşı 20-65, yaş ortalaması  $\pm$  SD: 31,2  $\pm$  11,7 arasındadır. 87'si kadın ve 73'ü erkektir.

Çalışmamızda PTPN22 genindeki R620W polimorfizmini 121 RKH hastasında ve 160 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunda taradık. Elde edilen veriler *Tablo 2* 'de görülmektedir.

G/G genotipi; 121 RKH hastasında, 114 kişide %94 oranında saptandı. G/A genotipini ise 7 hasta %6 oranında taşımaktaydı. A/A genotipi 121 hasta grubunda gözlenmemiştir. Bu veriler ışığında RKH hastalarında G/G genotipinin %94 oranında en yaygın genotip olduğu saptanmıştır.

Sağlıklı kontrol grubundan oluşan 160 kişiden 153 sağlıklı bireyin %96 oranında G/G genotipinde olduğu saptanmıştır. G/A genotipini 7 sağlıklı birey %4 oranında taşımaktaydı. A/A genotipi çalışmış olduğumuz kontrol grubunda bulunmamıştır.

Çalışmış olduğumuz RKH hastaları ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında, risk artışı getireceğini düşündüğümüz A allelini taşıyan G/A genotipindeki heterozigotların OR'nin (Odds Ratio) 1,34 olduğu ve P değerinin 0,592 olduğu görülmüştür. %95CI; 0,46-3,93'tür (*Çizelge 3.1*).

PTPN22 genindeki R620W polimorfizminin RKH hastaları ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilerin allel dağılımlarına baktığımızda; Hasta grubunda 235 kromozomun G allelini taşıdığı, 7 kromozomun A alleli taşıdığı görülmüştür.

RKH hastalarında A allelinin risk artışı getirip getirmediğini incelemek için sağlıklı kontrollerle karşılaştırdığımızda; çalışmamızda A allelinin OR'si 1,33'dür. OR değeri 2'nin üzerinde ise yüksek olarak nitelendirilir. P değerinin anlamlı olabilmesi için 0,05'in altında olması gerekirken çalışmamızda P değeri 0,597'dir. Çalışmamızdaki güven aralığı %95CI; 0,46-3,93 'dür. Bu değerler iki grup arasında mevcut allellerin herhangi bir risk artışı taşımadığını göstermektedir (Çan , 2006).

Çalışmaya aldığımız iki grup arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.(P>0.05)

**Çizelge 3.1 - RKH Hastalarında ve Sağlıklı Kontrollerde PTPN22 Geni R620W Polimorfizmi Genotip Dağılımları ve Allel Sıklığı**

| <b>PTPN22<br/>R620W</b> | <b>RKH<br/>(n=121)</b> | <b>%</b> | <b>Sağlıklı<br/>Kontrol Grubu<br/>(n=160)</b> | <b>%</b> | <b>OR</b> | <b>P</b> | <b>95% CI</b> |
|-------------------------|------------------------|----------|-----------------------------------------------|----------|-----------|----------|---------------|
| <b>Genotip</b>          |                        |          |                                               |          |           |          |               |
| <b>GG</b>               | 114                    | 94       | 153                                           | 96       | 1         |          |               |
| <b>GA</b>               | 7                      | 6        | 7                                             | 4        | 1,34      | 0,592    | 0,46 3,93     |
| <b>AA</b>               | --                     |          | --                                            |          |           |          |               |
| <b>Allel</b>            |                        |          |                                               |          |           |          |               |
| <b>G</b>                | 235                    | 97       | 313                                           | 98       | 1         |          |               |
| <b>A</b>                | 7                      | 3        | 7                                             | 2        | 1,33      | 0,597    | 0,46 3,85     |

#### 4.TARTIŞMA

Akut Romatizmal Ateş (ARA) A grubu ve Beta hemolitik streptokoklara bağlı gelişen faranjitten sonra ortaya çıkan multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. İlerleyen ve kalıcı kalp kapak lezyonları Romatizmal Kalp Hastalığı (RKH) olarak bilinir ve hastalığın en çok korkulan komplikasyonudur.

Hastalık cinsiyet ve ırk ayrımı gözetmez ancak ailesel eğilim önemlidir. İkiz çalışmaları hastalığın genetik temelini ortaya koymaktadır. Son yıllarda ARA'nın altında yatan genetik nedenleri ortaya çıkarmak için çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle HLA Class II genleriyle hastalık arasındaki ilişki incelenmiştir. Farklı toplumlardan yapılan çalışmalarda farklı HLA antijenleri ARA/RKH ile ilişkilendirilmiştir. Güney Afrikada Afrikalılar ile yapılan bir çalışmada HLA DR1 hastalıkla ilişkilendirilmişken, ABD de afrikalı amerikalılar üzerinde yapılan bir çalışmada HLA – DR2 anlamlı bulunmuştur. Amerikalı Beyaz ırkta yapılan çalışmalarda ise DR4 ün anlamlı olduğu gösterilmiştir. Hindu ve Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda DR3 hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Brezilya, Türkiye, Mısır ve Litvanya RKH hastalarında DR7 ilişkisi rapor edilmiştir (Guédez ve ark., 1999; Guilherme ve ark., 1991; Guilherme ve ark., 1995; Haydardedeoğlu ve ark., 2006; Ozkan ve ark., 1993; Visentainer ve ark., 2000).

MHC Class II molekülünün otoimmün hastalığa nasıl yatkınlık oluşturduğunun moleküler mekanizması açık değilsede HLA Class II allellerinin bazı streptokokkal peptitlerin sunumunu kolaylaştırdığı, bunun sonucunda da otoimmün reaksiyonun başladığı düşünülmektedir.

ARA/RKH hastalarında non-HLA genleri de incelenmiştir. RKH moleküler benzerlik esasına dayanan T-hücre aracılı otoimmün karakterde bir hastalıktır, hastalığın ortaya çıkış mekanizmasında yer alan proteinler ve onları kodlayan genler hastalığa yatkınlık için aday genlerdir. İşlevleri nedeniyle hastalığa yatkınlık yapabileceği düşünülen genler çeşitli çalışmalarda incelenmiştir.

Doğal immün sistemde patojenlerin tanınmasını sağlayan TLR genleri ARA hastalarında incelenmiş ve bazı çalışmalarda anlamlı bulunmuştur. Berdeli ve arkadaşları TLR-2 genindeki Arg753Gln polimorfizminin ARA hastalarıyla kuvvetli birliktelik saptarken, Düzgün ve arkadaşları TLR2 genindeki bu polimorfizminin bu hastalıkla ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (Berdeli ve ark., 2006, Düzgün ve ark., 2007) .

Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) immün cevap sırasında T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun negatif düzenleyicisidir ve ARA hastalığı için aday bir gen olarak araştırılmıştır. CTLA 4 genindeki A49G polimorfizmi ülkemizden Düzgün ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ARA/RKH ile ilişkili bulunmuştur (Düzgün ve ark., 2009).

Protein Tirozin Fosfataz Non Reseptör 22 (PTPN22) geni R620W polimorfizmi, T-hücre reseptör sinyalinin down regülasyonuna ve otoreaktif T-hücre oluşumuna neden olur. RKH’de kalp lezyonlarında T-hücreleri önemli bir rol oynar, çalışmalar hastalığın T-hücre aracılı otoimmün bir hastalık olduğunu gösterir (Guilherme ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalarda PTPN22 geni R620W polimorfizminin pek çok T-hücre aracılı otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu bulunmuştur. Meta analizler PTPN22 genindeki C1858T polimorfizminin taşıdığı T allelinin (R620W) Beyaz ırkda romatoid artrit, SLE, Graves hastalığı ve Tip I diabetes mellitus hastalıklarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Hastalıkla ilişkili T allelinin kodladığı proteinin, protein tirozin kinaz Csk’ ya bağlanmadığı ve bu nedenle T hücrelerinde aşırı tepkisizliğe neden olduğu düşünülmektedir.

Johansson ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada PTPN22 gen R620W polimorfizmi ile cyclic citrullinated peptid (CCP) antikorlarının romatoid artrit gelişimine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Johansson ve ark, 2006). Alman romatoid artrit hastalarında PTPN22 gen R620W polimorfizmi kadın hastalara göre erkek hastalarda daha fazla bulunmuş ve romatoid artrit ile bu polimorfizm arasındaki

ilişki gösterilmiştir (Pierer ve ark, 2006). PTPN22 geni R620W polimorfizmi Beyaz popülasyonda (Kuzey Amerikalı, İspanyol, İngiliz, Alman, Macar, İsveçli) romatoid artritli hastalarda majör risk faktörü olarak bulunmuştur (Lee ve ark., 2007; Begovich ve ark., 2004; Orozco ve ark., 2005; Lee ve ark., 2005; Michou ve ark., 2007; Farago ve ark., 2009).

Kyogoku ve arkadaşları PTPN22 gen R620W polimorfizminin SLE ile ilişkisini göstermişlerdir (Kyogoku ve ark., 2004). Viken ve arkadaşları Norveç popülasyonunda PTPN22 gen R620W polimorfizmi ile SLE arasında ilişki saptamamışlardır (Viken ve ark., 2005).

Bottini ve arkadaşları PTPN22 gen R620W polimorfizminin Tip I Diabetes Mellitus ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Bottini ve ark., 2004). Velaga ve arkadaşları PTPN22 gen R620W polimorfizmi ile Graves hastalığı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Velaga ve ark., 2004). Japon popülasyonunda PTPN22 geninin T varyantı Graves hastalarında görülmemiştir (Ichimura ve ark., 2008).

PTPN22 R620W polimorfizminin birliktelik gösterdiği otoimmün hastalıkların yanında bugüne kadar anlamlı bulunmadığı otoimmün hastalıklar da bildirilmiştir. Lee ve arkadaşları tarafından yapılan meta analizlerde psoriyazis, Çölyak hastalığı, Addison hastalığı, inflamatuvar barsak hastalığı ve multiple skleroz hastalığı ile PTPN22 R620W arasında herhangi bağlantı görülmemiştir. (Lee ve ark., 2007) İspanya da Beyaz ırkda yapılan çalışmalarda dev hücreli arterit (Gonzalez ve ark., 2005), primer sklerozan kolanjit (Viken ve ark., 2005) ve ankilozan spondilit (Orozco ve ark., 2006) ile R620W birlikteliği görülmemiştir.

Bugüne kadar RKH hastalarında PTPN22 gen polimorfizmlerinin incelendiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, PTPN22 geni R620W polimorfizminin, Romatoid Artrit (Şahin ve ark., 2009) Takayasu Arteriti (Şahin ve ark., 2008) ve Behçet hastalığı (Şahin ve ark., 2007) ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda PTPN22 geni R620W polimorfizmi ile RKH hastalığı arasında bir ilişki bulamadık. Gerek romatizmal kalp hastaları gerekse sağlıklı kontrollerde A/A genotipini tespit etmedik. G/A heterozigotlar ise hastalarda %6 kontrollerde ise %4 ile istatistiksel olarak anlamlı değildi (OR:1,34 P:0,592 ). R620W allel sıklığı ise hastalarda %3 ve kontrollerde %2 ile yine anlamlı bir farklılık göstermiyordu. Kadın ve erkek hastaları kıyasladığımızda ise, G/A genotipini taşıyan ( % 6,9'u kadın ve %5,1 'i erkek) hasta oranları arasında dikkate değer bir fark gözlemlenemedi.

R620W polimorfizmiyle ilgili önemli bir durum allel sıklığındaki varyasyondur. Romatoid artrit, Tip I Diabetes Mellitus hastaları ve sağlıklı kontrollerle yapılan çalışmalar bu polimorfizmin etnik farklılığını ortaya koymuştur (Cinek ve ark., 2007; Gomez ve ark., 2005; Balada ve ark., 2006). Minor T alleli (R620W), Beyaz ırkda Kuzey Avrupadan Güney Avrupaya doğru inildikçe belirgin bir düşüş gösterir. Minör alel için en yüksek allel sıklığı İskandinav ülkelerindedir, T allel sıklığı İsveçte %12,3 Finlandiyada %15,5'dir. Batı Avrupadaki minör allel sıklığı % 7-10 arasındadır. Avrupadaki en düşük minor allel % 2,1 ile İtalyada'dır. C1858T SNP'i Beyaz ırk dışında Afrika ve Asya populasyonlarında gözlenmemiştir. Beyaz ırkın kendi içinde dahi görülen bu allel sıklığındaki farklılık, vaka-kontrol çalışmalarında hasta ve kontrol grubunun dikkatli seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır (Sharon ve ark., 2007).

Biz yaptığımız çalışmada hem kontrollerde hemde RKH grubunda R620W allel sıklığını oldukça düşük tespit ettik (%2 kontroller %3 RKH hastaları). Ülkemizden yapılan diğer çalışmalarda PTPN22 R620W allelinin sıklığı sağlıklı popülasyonda %2.5 bulunmuştur (Şahin ve ark., 2009). Bu oran bizim sağlıklı kontrol grubumuz ile uyum göstermektedir.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda özellikle Beyaz ırkda PTPN22 R620W polimorfizminin otoimmün hastalıklarla birlikteliği gösterilmiştir. RKH'da yaptığımız bu çalışma, ülkemizden yapılan diğer çalışmalar, bu polimorfizmin ülkemizde otoimmün hastalıkların altında yatan genetik nedenlerden

biri olmadığını göstermektedir. PTPN22 genindeki R620W polimorfizmi dışında başka polimorfizmlerin; promotor bölgedeki G-1123C (rs2488457) polimorfizmi ile SNP37 (rs3789604) polimorfizminin incelenmesinin ülkemizde yapılan çalışmalarda ek bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 5. SONUÇ

Çalışmamızda RKH’de PTPN22 geni R620W polimorfizminin hastalığa yatkınlık sağlayan genetik faktörlerden biri olup olmadığını araştırdık. Çalışmanın sonucunda PTPN22 geni R620W polimorfizminin RKH hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık.( $P>0,05$ )

## ÖZET

### **Romatizmal Kalp Hastalığında Protein Tirozin Fosfataz Non Reseptör 22 Gen Polimorfizmi**

ARA, grup A Beta Hemolitik Streptokokkal farenjite karşı aşırı immün cevap sonucu oluşan sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. İnsan hedef organ/dokuları ve infeksiyon ajanının özgün komponentleri arasındaki moleküler mimikri, RKH’de otoimmün reaksiyon gelişimine ve kardiyak doku yıkımına neden olur. PTPN22 geni R620W (rs2476601 G/A) polimorfizminin pek çok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmada RKH’de PTPN22 R620W gen polimorfizminin hastalığa yatkınlık sağlayan genetik faktörlerden biri olup olmadığını araştırdık.

Çalışmaya 121 RKH hastası ve 160 sağlıklı kontrol grubu alındı. Hasta ve kontrol grubunda periferik venöz kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonundan sonra polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan DNA’larda, kesim parçacıkları uzunluk polimorfizmi yöntemi kullanılarak polimorfizmler incelendi. PTPN22 geni R620W G/A polimorfizmini içine alan gen bölgesine özgül primerler kullanılarak PCR tekniği ile amplifiye edildi.

Çalışmanın sonucunda PTPN22 genindeki R620W polimorfizminin RKH hastaları ve kontrol grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermediğini saptadık.

**Anahtar Sözcükler:** Gen polimorfizmi, Protein Tirozin Fosfataz Non Reseptör 22, Romatizmal Kalp Hastalığı,

## SUMMARY

### **Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor 22 Gene Polymorphism in Rheumatic Heart Disease**

Acute rheumatic fever (ARF) is a systemic inflammatory disease occurring as a consequence of an exaggerated immune response to group A, beta haemolytic streptococcal pharyngitis. The molecular mimicry between human target organs/tissues and specific components of the infectious organism leads to the development of autoimmune reactions and cardiac tissue damage in rheumatic heart disease (RHD). The R620W (rs2476601 G/A) polymorphism in PTPN22 gene, is known to be related with many autoimmune diseases. In this study we investigated whether PTPN22 R620W gene polymorphism is one of the genetic factors that confer susceptibility to RHD.

121 RHD patients and 160 healthy control were studied. DNA was isolated from peripheral venous blood of patients and controls. For PTPN22 R620W G/A gene polymorphism DNA was amplified by polymerase chain reaction technique, PCR product were genotyped by restriction length fragment polymorphism technique.

PTPN22 R620W gene polymorphism did not show statistically significant difference between with RHD patients and control group.

**Key words:** Gene polymorphism. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor 22, Rheumatic Heart Disease,

## KAYNAKLAR

- ADDERSON EE, SHIKHMAN AR, WARD KE, CUNNINGHAM MW (1998). Molecular analysis of polyreactive monoclonal antibodies from rheumatic carditis: human anti-N-acetylglucosamine/anti-myosin antibody V region genes. *J.Immunol.* **161**(4):2020-31.
- ANASTASIOU-NANA MI, ANDERSON JL, CARLQUIST JF, NANAS JN (1986). HLA-DR typing and lymphocyte subset evaluation in rheumatic heart disease: a search for immune response factors. *Am Heart J.* **112**(5):992-7.
- AYOUB EM. Acute rheumatic fever. In: Moss and Adams Heart Disease in Infants, children and adolescents (2001). Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DJ (eds). 6th ed. Philadelphia: *Lipincott Williams & Wilkins*. p. 1226-1241.
- AYOUB EM, BARRETT DJ, MACLAREN NK, KRISCHER JP (1986). Association of class II human histocompatibility leukocyte antigens with rheumatic fever. *J Clin Invest.* **77**(6):2019-26.
- BALADA E, VILLARREAL-TOLCHINSKY J, ORDÍ-ROS J, LABRADOR M, SERRANO-ACEDO S, MARTÍNEZ-LOSTAO L, VILARDELL-TARRÉS M. (2006). Multiplex family-based study in systemic lupus erythematosus: association between the R620W polymorphism of PTPN22 and the FcγRIIIa (CD32A) R131 allele. *Tissue Antigens.* **68**(5):432-8.
- BEGOVICH AB, CAILLIER SJ, ALEXANDER HC, PENKO JM, HAUSER SL, BARCELLOS LF, OKSENBERG JR. (2005). The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet.* **76**(1):184-7.
- BEGOVICH AB, CARLTON VE, HONIGBERG LA, SCHRODI SJ, CHOKKALINGAM AP, ALEXANDER HC, ARDLIE KG, HUANG Q, SMITH AM, SPOERKE JM, CONN MT, CHANG M, CHANG SY, SAIKI RK, CATANESE JJ, LEONG DU, GARCIA VE, MCALLISTER LB, JEFFERY DA, LEE AT, BATLIWALLA F, REMMERS E, CRISWELL LA, SELDIN MF, KASTNER DL, AMOS CI, SNINSKY JJ, GREGERSEN PK. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* **75**(2):330-7
- BERDELI A, TABEL Y, CELİK HA, OZYÜREK R, DOGRUSOZ B, AYDIN HH. (2006). Lack of association between TNFα gene polymorphism at position -308 and risk of acute rheumatic fever in Turkish patients. *Scand J Rheumatol.* **35**(1):44-7.

- BHAT MS, WANI BA, KOUL PA, BISATI SD, KHAN MA, SHAH SU. (1997). HLA antigen pattern of Kashmiri patients with rheumatic heart disease. *Indian J Med Res.* **105**:271-4.
- BHATIA R, NARULA J, REDDY KS, KOICHA M, MALAVIYA AN, POTHINENI RB, TANDON R, BHATIA ML. (1989). Lymphocyte subsets in acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin. Cardiol.* **12**(1):34-8.
- BISNO AL. (1991) Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N Engl J Med.* **325**(11):783-93.
- BOTTINI N, MUSUMECI L, ALONSO A, RAHMOUNI S, NIKA K, ROSTAMKHANI M, MACMURRAY J, MELONI GF, LUCARELLI P, PELLECCIA M, EISENBARTH GS, COMINGS D, MUSTELIN T. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat. Genet.* **36**(4):337-8.
- BRAND O, GOUGH S, HEWARD J. (2005). HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med.* **7**(23):1-15.
- BRYANT PA, ROBINS-BROWNE R, CARAPETIS JR, CURTIS N. ( 2009). Some of the people, some of the time: susceptibility to acute rheumatic fever. *Circulation* **119**(5):742-53.
- CARAPETIS JR, McDONALD M, WILSON NJ. (2005). Acute rheumatic fever. *Lancet* **366**(9480):155-68.
- CARLTON VE HU X, CHOKKALINGAM AP, SCHRODI SJ, BRANDON R, ALEXANDER HC, CHANG M, CATANESE JJ, LEONG DU, ARDLIE KG, KASTNER DL, SELDIN MF, CRISWELL LA, GREGERSEN PK, BEASLEY E, THOMSON G, AMOS CI, BEGOVICH AB. (2005). PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* **77**(4):567-81.
- CINEK O, HRADSKY O, AHMEDOV G, SLAVCEV A, KOLOUSKOVA S, KULICH M, SUMNIK Z. (2007). No independent role of the -1123 G>C and +2740 A>G variants in the association of PTPN22 with type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis in two Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract.* **76**(2):297-303.
- CLOUTIER JF, VEILLETTE A. (1996). Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J.* **15**(18):4909-18.
- COHEN S, DADI H, SHAOUL E, SHARFE N, ROIFMAN CM. (1999). Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine

phosphatase, Lyp. *Blood*. **93**(6):2013-24.

CUNNINGHAM MW, ANTONE SM, SMART M, LIU R, KOSANKE S. (1997). Molecular analysis of human cardiac myosin-cross-reactive B- and T-cell epitopes of the group A streptococcal M5 protein. *Infect Immun*. **65**(9):3913-23.

ÇAN G. (2006). Epidemiyolojik araştırmalarda risk kavramı ve risk değerlendirmesi. *TAF Prev Med Bull*. **5**(5): 374-381.

DALE JB, SIMPSON WA, OFEK I, BEACHEY EH (1981). Blastogenic responses of human lymphocytes to structurally defined polypeptide fragments of streptococcal M protein. *J Immunol*. **126**(4):1499-505.

DÜZGÜN N, HAYDARDEDEOĞLU FE. (2004) Akut Romatizmal Ateş ve HLA İlişkisi  
A. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri; P. NO:2003 /08/09/119

DÜZGÜN N, DUMAN T, HAYDARDEDEOĞLU FE, TUTKAK H. (2007). The lack of genetic association of the Toll-like receptor 2 (TLR2) Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms with rheumatic heart disease. *Clin Rheumatol*. **26**(6):915-9.

DÜZGÜN N, DUMAN T, HAYDARDEDEOĞLU FE, TUTKAK H. (2009). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 polymorphism in patients with rheumatic heart disease. *Tissue Antigens*. **74**(6):539-542

FAÉ KC, OSHIRO SE, TOUBERT A, CHARRON D, KALİL J, GUILHERME L. (2005). How an autoimmune reaction triggered by molecular mimicry between streptococcal M protein and cardiac tissue proteins leads to heart lesions in rheumatic heart disease. *J Autoimmun*. **24**(2):101-9.

FARAGO B, TALIAN GC, KOMLOSI K, NAGY G, BERKI T, GYETVAI A, SZEKANECZ Z, NYARADY Z, KISS CG, NEMETH P, CZIRJAK L, MELEGH B. (2009). Protein tyrosine phosphatase gene C1858T allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects. *Rheumatol Int*. **29**(7):793-6.

FRASER WJ, HAFEEJEE Z, JANKELOW D, WADEE A, COOPER K. (1997). Rheumatic Aschoff nodules revisited. II: Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. *Histopathology*. **31**(5):460-4.

GALAL ME, MEDHAT ME, KHALID AS, HOWAIDA GE. (1998). Rheumatic fever and rheumatic heart disease. In: The Science and practice of Pediatric Cardiology. Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR (eds). 2nd ed. Baltimore: *Williams and Wilkins*, 1691-24.

- GARCÍA KC, TEYTON L, WILSON IA. (1999) Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol.* **17**:369-97.
- GALVÍN JE, HEMRIĆ ME, WARD K, CUNNINGHAM MW. (2000). Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J Clin Invest.* **106**(2):217-24.
- GOMEZ LM, ANAYA JM, GONZALEZ CI, PÍÑEDA-TAMAYO R, OTERO W, ARANGO A, MARTÍN J. (2005) PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun.* **6**(7):628-31.
- GONZALEZ-GAY MA, OLIVER J, OROZCO G, GARCÍA-PORRUA C, LOPEZ-NEVOT MA, MARTÍN J. (2005). Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* **32**(8):1510-2.
- GRAY ED, WANNAMAKER LW, AYOUB EM, EL KHOLY A, ABDIN ZH. (1981). Cellular immune responses to extracellular streptococcal products in rheumatic heart disease. *J Clin Invest.* **68**(3):665-71.
- GROSS WL, SCHLAACK M. (1984). Modulation of human lymphocyte functions by group A streptococci. *Clin Immunol Immunopathol.* **32**(2):234-47.
- GUÉDEZ Y, KOTBY A, EL-DEMELLAWY M, GALAL A, THOMSON G, ZAHER S, KASSEM S, KOTBY M. (1999). HLA class II associations with rheumatic heart disease are more evident and consistent among clinically homogeneous patients. *Circulation.* **99**(21):2784-90.
- GUÍLHERME L, CUNHA-NETO E, COELHO V, SNITCOWSKY R, POMERANTZEFF PM, ASSIS RV, PEDRA F, NEUMANN J, GOLDBERG A, PATARROYO ME, ET AL. (1999). Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation.* **92**(3):415-20.
- GUÍLHERME L, CURY P, DEMARCHI LM, COELHO V, ABEL L, LOPEZ AP, OSHIRO SE, ALIOTTI S, CUNHA-NETO E, POMERANTZEFF PM, TANAKA AC, KALIL J. (2004). Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol.* **165**(5):1583-91.
- GUÍLHERME L, FAÉ K, OSHIRO SE, KALIL J. (2006). Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Exp Rev in Mol Med.* **7**(28):1-15.
- GUÍLHERME L, OSHIRO SE, FAÉ KC, CUNHA-NETO E, RENESTO G, GOLDBERG AC, TANAKA AC, POMERANTZEFF PM, KISS MH, SILVA C, GUZMAN F, PATARROYO ME, SOUTHWOOD S, SETTE A, KALIL J. (2001). T-cell reactivity against streptococcal

antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. *Infect Immun.* **69**(9):5345-51.

GUÍLHERME L, WEIDEBACH W, KISS MH, SNITCOWSKY R, KALIL J. (1991). Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. *Circulation.* **83**(6):1995-8.

GULIZIA JM, CUNNINGHAM MW, MCMANUS BM.(1991). Immunoreactivity of antistreptococcal monoclonal antibodies to human heart valves. Evidence for multiple çapraz-reactive epitopes. *Am J Pathol.* **138**(2):285-301.

HARRINGTON Z, VISVANATHAN K, SKINNER NA, CURTIS N, CURRIE BJ, CARAPETIS JR. (2006). B-cell antigen D8/17 is a marker of rheumatic fever susceptibility in Aboriginal Australians and can be tested in remote settings. *Med J Aust.* **184**(10):507-10.

HAYDARDEDEOĞLU FE, TUTKAK H, KÖSE K, DÜZGÜN N. (2006). Genetic susceptibility to rheumatic heart disease and streptococcal pharyngitis: association with HLA-DR alleles. *Tissue Antigens.* **68**(4):293-6.

HERNÁNDEZ-PACHECO G, AGUILAR-GARCÍA J, FLORES-DOMÍNGUEZ C, RODRÍGUEZ-PÉREZ JM, PÉREZ-HERNÁNDEZ N, ALVAREZ-LEON E, REYES PA, VARGAS-ALARCÓN G. (2003). MHC class II alleles in Mexican patients with rheumatic heart disease. *Int J Cardiol.* **92**(1):49-54.

HILL RJ, ZOZULYA S, LU YL, WARD K, GISHIZKY M, JALLAL B. (2002). The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Exp Hematol.* **30**(3):237-44.

ICHIMURA M, KAKU H, FUKUTANI T, KOGA H, MUKAI T, MIYAKE I, YAMADA K, KODA Y, HIROMATSU Y. (2008). Associations of protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) gene polymorphisms with susceptibility to Graves' disease in a Japanese population. *Thyroid.* **18**(6):625-30.

JHINGHAN B, MEHRA NK, REDDY KS, TANEJA V, VAIDYA MC, BHATIA ML. (1986). HLA, blood groups and secretor status in patients with established rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Tissue Antigens.* **27**(3):172-8.

JOHANSSON M, ARLESTIG L, HALLMANS G, RANTAPÄÄ-DAHLQVIST S. (2006). PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Research & Therapy* **8**:R19 (doi:10.1186/ar1868)

- KALLBERG H, PADYUKOV L, PLENKE RM, RONNELID J, GREGERSEN PK, VAN DER HELM-VAN MIL AH, TOES RE, HUIZINGA TW, KLARESKOG L, ALFREDSSON L. (2007). Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* **80**(5):867-75.
- KAPLAN MH, SUCHY ML. (1964a). Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. II. Cross-reaction of antisera to mammalian heart tissue with a cell wall constituent of certain strains of group A streptococci. *J Exp Med.* **119**:643-50.
- KAPLAN MH, SVEC KH. (1964b). Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. III. Presence in human sera of streptococcal antibody cross-reactive with heart tissue. Association with streptococcal infection, rheumatic fever, and glomerulonephritis. *J Exp Med.* **119**:651-66.
- KAWASAKI E, AWATA T, IKEGAMI H, KOBAYASHI T, MARUYAMA T, NAKANISHI K, SHIMADA A, UGA M, KURIHARA S, KAWABATA Y, TANAKA S, KANAZAWA Y, LEE I, EGUCHI K. (2006). Systematic search for single nucleotide polymorphisms in a lymphoid tyrosine phosphatase gene (PTPN22): association between a promoter polymorphism and type 1 diabetes in Asian populations. *Am J Med Genet A.* **140**(6):586-93.
- KIRVAN CA, SWEDO SE, HEUSER JS, CUNNINGHAM MW. (2003). Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med.* **9**(7):914-20.
- KOTB M, COURTNEY HS, DALE JB, BEACHEY EH. (1989) Cellular and biochemical responses of human T lymphocytes stimulated with streptococcal M proteins. *Immunol.* **142**(3):966-70.
- KOYANAGI T, KOGA Y, NISHI H, TOSHIMA H, SASAZUKI T, IMAIZUMI T, KIMURA A. (1996). Typing of HLA class II genes in Japanese patients with rheumatic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* **28**(6):1349-53.
- KYOGOKU C, LANGEFELD CD, ORTMANN WA, LEE A, SELBY S, CARLTON VE, CHANG M, RAMOS P, BAECHLER EC, BATLIWALLA FM, NOVITZKE J, WILLIAMS AH, GILLET C, RODINE P, GRAHAM RR, ARDLIE KG, GAFFNEY PM, MOSER KL, PETRI M, BEGOVICH AB, GREGERSEN PK, BEHRENS TW. (2004). Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* **75**(3):504-7.
- LEE AT, LI W, LIEW A, BOMBARDIER C, WEISMAN M, MASSAROTTI EM, KENT J, WOLFE F, BEGOVICH AB, GREGERSEN PK. (2005). The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.* **6**(2):129-33.

- LEE YH, RHO YH, CHOI SJ, JI JD, SONG GG, NATH SK, HARLEY JB. (2007). The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. **46**(1):49-56.
- MAHARAJ B, HAMMOND MG, APPADOO B, LEARY WP, PUDIFIN DJ. (1987). HLA-A, B, DR, and DQ antigens in black patients with severe chronic rheumatic heart disease. *Circulation*. **76**(2):259-61.
- MARTIN JM, BARBADORA KA. (2006). Continued high caseload of rheumatic fever in western Pennsylvania: Possible rheumatogenic emm types of streptococcus pyogenes. *J Pediatr*. **149**(1):58-63.
- MATTHEWS RJ, BOWNE DB, FLORES E, THOMAS ML. (1992). Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol*. **12**(5):2396-405.
- MESSIAS REASON IJ, SCHAFRANSKI MD, JENSENIUS JC, STEFFENSEN R. (2006). The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. *Hum Immunol*. **67**(12):991-8.
- MICHOU L, LASBLEIZ S, RAT AC, MIGLIORINI P, Balsa A, WESTHOVENS R, BARRERA P, ALVES H, PIERLOT C, GLIKMANS E, GARNIER S, DAUSSET J, VAZ C, FERNANDES M, PETIT-TEIXEIRA E, LEMAIRE I, PASCUAL-SALCEDO D, BOMBARDIERI S, DEQUEKER J, RADSTAKE TR, VAN RIEL P, VAN DE PUTTE L, LOPES-VAZ A, PRUM B, BARDIN T, DIEUDE P, CORNELIS F; EUROPEAN CONSORTIUM ON RHEUMATOID ARTHRITIS FAMILIES. (2007). Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(5):1649-54.
- MONPLAISIR N, VALETTE I, BACH JF. (1986). HLA antigens in 88 cases of rheumatic fever observed in Martinique. *Tissue Antigens*. **28**(4):209-13.
- MORRIS K, MOHAN C, WAHI PL, ANAND IS, GANGULY NK. (1993). Enhancement of IL-1, IL-2 production and IL-2 receptor generation in patients with acute rheumatic fever and active rheumatic heart disease; a prospective study. *Clin Exp Immunol*. **91**(3):429-36.
- NARIN N, KÜTÜKÇÜLER N, OZYÜREK R, BAKİLER AR, PARLAR A, ARCASOY M. (1995). Lymphocyte subsets and plasma IL-1 alpha, IL-2, and TNF-alpha concentrations in acute rheumatic fever and chronic rheumatic heart disease. *Clin Immunol Immunopathol*. **77**(2):172-6.

- NARULA J, CHANDRASEKHAR Y, RAHİMTOOLA S. (1999). Diagnosis of active rheumatic carditis. The echoes of change. *Circulation*. **100**(14):1576-81.
- OLGUNTURK R, CANTER B, TUNAOGLU FS, KULA S. (2006). Review of 609 patients with rheumatic fever in terms of revised and updated Jones criteria. *Int J Cardiol*. **112**(1):91-8.
- ÖLMEZ U, TURGAY M, OZENİRLER S, TUTKAK H, DÜZGÜN N, DUMAN M, TOKGÖZ G. (1993). Association of HLA class I and class II antigens with rheumatic fever in a Turkish population. *Scand J Rheumatol*. **22**(2):49-52.
- OROZCO G, GARCÍA-PORRÚA C, LÓPEZ-NEVOT MA, RAYA E, GONZÁLEZ-GAY MA, MARTÍN J. (2006). Lack of association between ankylosing spondylitis and a functional polymorphism of PTPN22 proposed as a general susceptibility marker for autoimmunity. *Ann Rheum Dis*. **65**(5):687-8.
- OROZCO G, SÁNCHEZ E, GONZÁLEZ-GAY MA, LÓPEZ-NEVOT MA, TORRES B, CÁLIZ R, ORTEGO-CENTENO N, JIMÉNEZ-ALONSO J, PASCUAL-SALCEDO D, Balsa A, DE PABLO R, NUÑEZ-ROLDAN A, GONZÁLEZ-ESCRIBANO MF, MARTÍN J. (2005). Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. **52**(1):219-24.
- ÖZKAN M, CARİN M, SÖNMEZ G, SENOC AK M, OZDEMİR M, YAKUT C. (1993). HLA antigens in Turkish race with rheumatic heart disease. *Circulation*. **87**(6):1974-8.
- PIERER M, KALTENHÄUSER S, ARNOLD S, WAHLE M, BAERWALD C, HÄNTZSCHEL H, WAGNER U. (2006). Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res Ther*. **8**(3):R75.
- PROFT T, FRASER JD. (2003). Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*. **133**(3):299-306.
- RAJAPAKSE CN, HALİM K, AL-ORAİNEY I, AL-NOZHA M, AL-ASKA AK. (1987). A genetic marker for rheumatic heart disease. *Br Heart J*. **58**(6):659-62.
- READ SE, FISCHETTI VA, UTERMÖHLEN V, FALK RE, ZABRISKIE JB. (1974). Cellular reactivity studies to streptococcal antigens. Migration inhibition studies in patients with streptococcal infections and rheumatic fever. *J Clin Invest*. **54**(2):439-50.

- ROBERTS WC, VİRMANİ R. (1978). Aschoff bodies at necropsy in valvular heart disease. Evidence from an analysis of 543 patients over 14 years of age that rheumatic heart disease, at least anatomically, is a disease of the mitral valve. *Circulation*. **57**(4):803-7.
- SAINANİ GS, SAINANİ AR. (2006). Rheumatic fever--how relevant in India today? *J Assoc Physicians India*. 54 Suppl:42-7.
- SHARON A. CHUNG AND LINDSEY A. CRISWELL (2007). PTPN22: Its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity*. **40**(8), Pages 582-590.
- SHIKHMAN AR, CUNNINGHAM MW. (1994). Immunological mimicry between N-acetyl-beta-D-glucosamine and cytokeratin peptides. Evidence for a microbially driven anti-keratin antibody response. *J Immunol*. **152**(9):4375-87.
- SKINNINGSRUD B, HUSEBYE ES, GERVİN K, LØVÅS K, BLOMHOFF A, WOLFF AB, KEMP EH, EGELAND T, UNDLIEN DE. (2008). Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *Eur J Hum Genet*. **16**(8):977-82.
- SMYTH D, COOPER JD, COLLINS JE, HEWARD JM, FRANKLYN JA, HOWSON JM, VELLA A, NUTLAND S, RANCE HE, MAIER L, BARRATT BJ, GUJA C, IONESCU-TÎRGOVISTE C, SAVAGE DA, DUNGER DB, WIDMER B, STRACHAN DP, RING SM, WALKER N, CLAYTON DG, TWELLS RC, GOUGH SC, TODD JA. (2004). Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*. **53**(11):3020-3.
- STANEVİCHA V, EGLİTE J, SOCHNEVS A, GARDOVSKA D, ZAVADSKA D, SHANTERE R. (2003). HLA class II associations with rheumatic heart disease among clinically homogeneous patients in children in Latvia. *Arthritis Res Ther*. **5**(6):R340-6.
- ŞAHİN N, BİCAKÇIĞİL M, ATAGUNDUZ P, DİRESKENELİ H, SARUHAN-DİRESKENELİ G. (2007) PTPN22 gene polymorphism in Behçet's disease. *Tissue Antigens*. **70**(5):432-4.
- ŞAHİN N, AKSU K, KAMALI S, BİCAKÇIĞİL M, OZBALKAN Z, FRESKO I, OZER H, AKAR S, ONAT AM, COBANKARA V, KİRAZ S, OZTÜRK MA, TUNÇ E, YÜCEL E, ATES A, KESER G, INANC M, DİRESKENELİ H, SARUHAN-DİRESKENELİ G; RAED VASCULİTİS STUDY GROUP. (2008). PTPN22 gene polymorphism in Takayasu's arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. **47**(5):634-5.
- ŞAHİN N, GÜNDÜZ F, INANC N, DİRESKENELİ H, SARUHAN-DİRESKENELİ G. (2009). No association of PTPN22 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Turkey. *Rheumatol Int*. **30**:81-83.

- TOMAI MA, AELION JA, DOCKTER ME, MAJUMDAR G, SPINELLA DG, KOTB M. (1991). T cell receptor V gene usage by human T cells stimulated with the superantigen streptococcal M protein. *J Exp Med.* **174**(1):285-8.
- WANNAMAKER LW. (1970). Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. *I. N Engl J Med.* **282**(1):23-31.
- WEIDEBACH W, GOLDBERG AC, CHIARELLA JM, GUILHERME L, SNITCOWSKY R, PILEGGI F, KALIL J. (1994). HLA class II antigens in rheumatic fever. Analysis of the DR locus by restriction fragment-length polymorphism and oligotyping. *Hum Immunol.* **40**(4):253-8.
- WRITING GROUP OF THE COMMITTEE(SPECIAL) ON RHEUMATIC FEVER, ENDOCARDITIS, AND KAWASAKI DISEASE OF THE COUNCIL ON CARDIOVASCULAR DISEASE IN THE YOUNG OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. (1992). Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. *JAMA.* **268**(15):2069-73.
- VANG T, CONGIA M, MACIS MD, MUSUMECI L, ORRÚ V, ZAVATTARI P, NIKA K, TAUTZ L, TASKÉN K, CUCCA F, MUSTELIN T, BOTTINI N. (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* **37**(12):1317-9.
- VEASY L.G. (1995). Rheumatic fever-T.Duckett Jones and rest of the history. *Cardiol Young* **5**:293-301.
- VELAGA MR, WILSON V, JENNINGS CE, OWEN CJ, HERINGTON S, DONALDSON PT, BALL SG, JAMES RA, QUINTON R, PERROS P, PEARCE SH. (2004). The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**(11):5862-5.
- VIKEN MK, AMUNDSEN SS, KVIEN TK, BOBERG KM, GILBOE IM, LILLEBY V, SOLLID LM, FØRRE OT, THORSBY E, SMERDEL A, LIE BA. (2005). Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun.* **6**(3):271-3.
- VIRMANI R, ROBERTS WC. (1977). Aschoff bodies in operatively excised atrial appendages and in papillary muscles. Frequency and clinical significance. *Circulation.* **55**(4):559-63.
- VISENTAINER JE, PEREIRA FC, DALALIO MM, TSUNETO LT, DONADIO PR, MOLITERNO RA. (2000). Association of HLA-DR7 with rheumatic fever in the Brazilian population. *J Rheumatol.* **27**(6):1518-20.

YEĞİN O, COŞKUN M, ERTUĞ H. (1997). Cytokines in acute rheumatic fever. *Eur J Pediatr.* **156**(1):25-9.

YOSHINAGA M, FIGUEROA F, WAHID MR, MARCUS RH, SUH E, ZABRISKIE JB. (1995). Antigenic specificity of lymphocytes isolated from valvular specimens of rheumatic fever patients. *J Autoimmun.* **8**(4):601-13.

YU X, SUN JP, HE Y, GUO X, LIU S, ZHOU B, HUDMON A, ZHANG ZY.( 2007). Structure, inhibitor, and regulatory mechanism of Lyp, a lymphoid-specific tyrosine phosphatase implicated in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(5):19767-72.

## EKLER

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY  
ANKARA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

|                   |                                 |                                                                                                                                                                       |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | PROTOKOL KODU                   |                                                                                                                                                                       |
|                   | PROTOKOL ADI                    | Romatizmal kalp hastalığında Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) ve protein tirozin fosfataz non-reseptör 22 (PTPN22) polimorfizmlerinin incelenmesi |
|                   | SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI | Prof.Dr.Nurşen Düzgün                                                                                                                                                 |
|                   | ARAŞTIRMA MERKEZİ               | Ankara Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Romatoloji Bilim Dalı                                                                               |
|                   | DESTEKLEYİCİ FİRMA              |                                                                                                                                                                       |

|                                 |                                |                         |      |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------|
| DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER | Belge Adı                      | Değişiklik No. / Tarihi | Dili |
|                                 | PROTOKOL                       |                         |      |
|                                 | ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ             |                         |      |
|                                 | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU |                         |      |
|                                 | OLGU RAPOR FORMU               |                         |      |

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| ÇALIŞMA ESASI | İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU |
|---------------|---------------------------------|

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No: 153-4862                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Tarih: 08 Haziran 2009 |
|                 | Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının fakültemizde yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi. |                        |

| ETİK KURUL ÜYELERİ                             |                    |                      |           |      |
|------------------------------------------------|--------------------|----------------------|-----------|------|
| Ünvanı / Adı / Soyadı                          | Uzmanlık Dalı      | Kurumu               | Cinsiyeti | İmza |
| Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan<br>Başkan         | Farmakoloji        | Ankara Tıp Fakültesi | E         |      |
| Prof. Dr. Efser Kerimoğlu<br>Başkan Yardımcısı | Çocuk Psikiyatrisi | Ankara Tıp Fakültesi | K         |      |
| Prof. Dr. Özden Palaoğlu<br>Sekreter           | Farmakoloji        | Ankara Tıp Fakültesi | K         |      |

Büyüyen KARATAŞOĞLU

Ankara Tıp Fakültesi

25/1/2009

## ÖZGEÇMİŞ

### **I- Bireysel Bilgiler**

Adı: Rahime

Soyadı: Aksoy

Dogum yeri ve tarihi: Yozgat / 20.08.1977

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Cihan sok. 29/9 Sıhhiye/Ankara - 05055025479

### **II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye dogru)**

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - 2004

Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Hiz. MYO Tıbbi Laboratuvar - 1999

Ankara Lisesi - 1994

Yabancı dili: İngilizce

### **III- Mesleki Deneyimi**

Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi İmmünoloji Laboratuvarı 2005-2010

Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Acil Biyokimya Laboratuvarı 2000-2005

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Merkez Biyokimya Laboratuvarı 1999-2000

### **IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluslar**

Transplantasyon İmmunolojisi ve Genetiği Derneği

### **V-Aldığı kurslar ve eğitim seminerleri**

Otoimmünite ve otoimmün hastalıklar sempozyumu 13-15 Nisan 2005

1. Ulusal transplantasyon immünolojisi ve genetiği kongresi 1-4 mayıs 2008