



**İSTANBUL  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***DOKTORA TEZİ***

**ROMATOİD ARTRİT VE TÜBERKÜLOZDA METAL İYON  
TAŞIYICI PROTEİN (SLC11A1-NRAMP1) GEN  
POLİMORFİZMİNİN ROLÜ**

***Uz.Tıb. Bio. Ömer ATEŞ***

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA**

**Haziran, 2007**

**İSTANBUL**

## **ÖNSÖZ**

Çalışmamda her türlü imkanı sağlayan değerli bölüm başkanım Prof.Dr. Güler TEMİZKAN'a,

Danışmanım olmasıyla kendimi çok şanslı ve ayrıcalıklı hissettiğim, hayata ve olaylara pozitif bakmayı öğreten, etik açıdan kendime örnek aldığım, çalışmalarım da bana her zaman tam destek veren danışmanım Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya,

Çalışma kriterlerine uygun hastaları temin eden, ve klinik konularda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Vedat HAMURYUDAN, Prof.Dr. Gül ÖNGEN, Doç.Dr. Benan MÜSELLİM ve Uzm.Dr. Hatice TÜRKEL'e, tez izleme komitemde yer alan, görüş ve önerileriyle çalışmamı şekillendiren ve cesaretlendiren Prof.Dr. Ayşe ÖZEN'e, laboratuvar çalışmalarım da yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli meslektaşım Tıb.Bio Levent DALYAN ve diğer arkadaşlarıma, doktora eğitimim süresince çalışma alanım dışında bana moral ve destek veren dostlarıma,

Genetiğin alfabesini öğrendiğim, akademik kişiliğimin şekillenmesinde büyük rol oynayan çok kıymetli lisans ve yüksek lisans hocam Prof.Dr. Nur BUYRU'ya,

Genlerini taşımaktan onur duyduğum, sevgileriyle yoğrulup olgunlaştığım, yaşam kaynağım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Haziran, 2007**

**Ömer ATEŞ**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	4
<b>2.1. ROMATOİD ARTRİT</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Romatoid Artrit Tarihçesi .....	4
2.1.2. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi.....	4
2.1.3. Romatoid Artrit Etiyolojisi.....	5
2.1.4. Romatoid Artrit Genetiği .....	7
<b>2.2. TÜBERKÜLOZ</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Tüberkülozun Tarihçesi .....	10
2.2.2. Tüberkülozun Epidemiyolojisi .....	10
2.2.3. Tüberküloz Genetiği.....	12
<b>2.3. METAL İYONU TAŞIYICI PROTEİN (NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN, SLC11A1-NRAMP1) GENİ</b> .....	<b>13</b>
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
<b>3.1. ÇALIŞMA GRUBU</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	19
3.2.2. DNA'nın Kalitatif Tayini .....	20
3.2.3. DNA'nın Kantitatif Tayini .....	20
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	21
3.2.5. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	27

3.2.6. Restriksiyon Enzim Analizi (REA).....	27
3.2.7. DNA Dizi Analizi.....	29
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	30
4.BULGULAR .....	31
<b>4.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU .....</b>	<b>31</b>
4.1.1. DNA'nın Kalitatif Tayini .....	31
4.1.2. DNA'nın Kantitatif Tayini .....	31
<b>4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Allele Özgü Nükleotidlerle Mutasyon Belirleme Tekniği (ARMS) .....	33
<b>4.3. RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ (REA).....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. DNA DİZİ ANALİZİ VERİLERİ.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI.....</b>	<b>46</b>
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
6. KAYNAKLAR .....	64
7. ÖZGEÇMİŞ.....	72

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1 :</b>	Makrofaj-patojen etkileşiminde NRAMP1'in ve NRAMP1'in bakteride homologu olan metal iyon taşıyıcısı (MIT)'nin işlevleri.....	16
<b>Şekil 2.2 :</b>	NRAMP1 geninin analiz edilen polimorfik bölgeleri.....	17
<b>Şekil 4.1 :</b>	Genomik DNA'ların % 1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.....	31
<b>Şekil 4.2 :</b>	NRAMP1 geninin D543N ve 3'UTR polimorfik noktalarını içeren 240 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü.....	32
<b>Şekil 4.3 :</b>	NRAMP1 geninin 5' promotör bölgesini içeren yaklaşık 199 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü.....	33
<b>Şekil 4.4 :</b>	NRAMP1 geninin D543N polimorfizminin incelendiği 190 bç'lik ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri.....	34
<b>Şekil 4.5 :</b>	NRAMP1 geninin 3'UTR polimorfizminin incelendiği ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri.....	35
<b>Şekil 4.6 :</b>	NRAMP1 geninin INT4 polimorfizminin incelendiği ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri.....	36
<b>Şekil 4.7 :</b>	NRAMP1 geninin D543N polimorfizminin incelendiği Eco471 (AvaII) restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri.....	38
<b>Şekil 4.8 :</b>	NRAMP1 geninin 3'UTR polimorfizminin incelendiği BseGI (FokI) restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri.....	38
<b>Şekil 4.9 :</b>	NRAMP1 geninin INT4 polimorfizminin incelendiği ApaI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri.....	39
<b>Şekil 4.10 :</b>	Allel 3/3'ün DNA Dizisi.....	41
<b>Şekil 4.11 :</b>	Allel 2/2'nin DNA Dizisi.....	42
<b>Şekil 4.12 :</b>	Allel 2/3'ün DNA Dizisi.....	43
<b>Şekil 4.13 :</b>	Allel 2/5'in DNA Dizisi.....	44
<b>Şekil 4.14 :</b>	Allel 3/5'in DNA Dizisi.....	45

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	: ARA tanı kriterleri.....	5
<b>Tablo 3.1</b>	: Romatoid artrit ve kontrol grubunun özellikleri.....	18
<b>Tablo 3.2</b>	: Tüberküloz ve kontrol grubunun özellikleri.....	19
<b>Tablo 3.3</b>	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve solüsyonlar.....	20
<b>Tablo 3.4</b>	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve solüsyonu.....	20
<b>Tablo 3.5</b>	: Primer isimleri ve baz dizileri.....	22
<b>Tablo 3.6</b>	: 5' Promotor bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.....	23
<b>Tablo 3.7</b>	: D543N ve 3'UTR bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.....	24
<b>Tablo 3.8</b>	: D543N bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.....	24
<b>Tablo 3.9</b>	: 3'UTR bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.....	25
<b>Tablo 3.10</b>	: INT4 bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.....	25
<b>Tablo 3.11</b>	: 5' Promotor bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan PZR programı.....	26
<b>Tablo 3.12</b>	: D543N ve 3'UTR bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan PZR programı.....	26
<b>Tablo 3.13</b>	: D543N, 3'UTR ve INT4 bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR programı.....	26
<b>Tablo 3.14</b>	: D543N polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.....	28
<b>Tablo 3.15</b>	: 3UTR polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.....	28
<b>Tablo 3.16</b>	: INT4 polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.....	28
<b>Tablo 3.17</b>	: 5' Promotor bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan Dizileme PZR karışımı.....	30
<b>Tablo 4.1</b>	: Romatoid artrit, tüberküloz ve kontrol grubunda D543N polimorfizm değerleri.....	34
<b>Tablo 4.2</b>	: Romatoid artrit, tüberküloz ve kontrol grubunda 3'UTR polimorfizm değerleri.....	35
<b>Tablo 4.3</b>	: Romatoid artrit, tüberküloz ve kontrol grubunda INT4 polimorfizm değerleri.....	36
<b>Tablo 4.4</b>	: NRAMP1 geninin 5' promotör bölgesindeki alleleri DNA dizisi.....	40
<b>Tablo 4.5</b>	: NRAMP1 geninin 5' promotör bölgesinin DNA dizi analizi bulguları.....	40
<b>Tablo 4.6</b>	: Romatoid artritte 5' promotör bölgesi polimorfizminin istatistiksel analizi.....	46

<b>Tablo 4.7</b>	: Romatoid artritte INT4 polimorfizminin istatistiksel analizi.....	47
<b>Tablo 4.8</b>	: Romatoid artritte D543N/3'UTR polimorfizminin istatistiksel analizi.....	48
<b>Tablo 4.9</b>	: Tüberkülozda 5' promotor bölgesi polimorfizminin istatistiksel analizi...	49
<b>Tablo 4.10</b>	: Tüberkülozda INT4 polimorfizminin istatistiksel analizi.....	49
<b>Tablo 4.11</b>	: Tüberkülozda D543N/3'UTR polimorfizminin istatistiksel analizi.....	50
<b>Tablo 4.12</b>	: Tüberküloz ve romatoid artritte NRAMP1 polimorfizmlerinin istatistiksel analizi.....	51
<b>Tablo 4.13</b>	: Romatoid artritnin klinik özelliklerinde NRAMP1 polimorfizmlerinin istatistik analizi.....	53
<b>Tablo 4.14</b>	: Tüberkülozun klinik özelliklerinde NRAMP1 polimorfizmlerinin istatistik analizi.....	54

## SEMBOL LİSTESİ

<b>1,25D3</b>	:1-25 dihidroksi vitamin-D3
<b>3'UTR</b>	:3' Translasyona Uğramayan Bölge
<b>ARA</b>	:American Rheumatism Association
<b>ARMS-PZR</b>	:Allele Özgü Primerlerle Mutasyon Belirleme-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>BCG</b>	:Bacillus Calmette-Guerin aşısı
<b>Bç</b>	:Baz çifti
<b>CI</b>	:Güven aralığı
<b>CRH</b>	:Kortikotropin Serbestleştirici Hormon
<b>CXC</b>	:Kemokin
<b>D543N</b>	:15. eksonda 543. amino asitte Aspartik asitin asparagine dönüşümü
<b>EBV</b>	:Epstein Barr Virüsü
<b>EDTA</b>	:Etilendiamin tetraasetikasit
<b>HBV</b>	:Hepatit B Virüsü
<b>HIV</b>	: 'Human Immundeficiency Virus'
<b>HLA</b>	: 'Human Leukocyte Antigen'
<b>Ig</b>	:İmmünglobülin
<b>IL</b>	:İnterlökin
<b>iNOS</b>	:İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>INT4</b>	:NRAMP1 geninin 4. intronu
<b>kDA</b>	:Kilodalton
<b>MBL</b>	:Mannoz Bağlayan Lektin
<b>NO</b>	:Nitröz oksit
<b>NRAMP1-SLC11A1</b>	:Metal İyonu Taşıyıcı Protein Geni
<b>OD</b>	:Optik Dansite
<b>PAS</b>	:Para Amino Salisilik asit
<b>PPD</b>	:Saflaştırılmış protein türevi
<b>RA</b>	:Romatoid Artrit
<b>REA</b>	:Restriksiyon Enzim Analizi
<b>RF</b>	:Romatoid Faktör
<b>SDS</b>	:Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SOD</b>	:Süper Oksit Dizmutaz
<b>TEB</b>	:Tris EDTA Borik asit
<b>TNF</b>	:Tümör Nekroz Faktörü
<b>TNFR</b>	:Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
<b>UV</b>	:UltraViyole
<b>VDR</b>	:Vitamin D Reseptörü

## ÖZET

### ROMATOİD ARTRİT VE TÜBERKÜLOZDA METAL İYON TAŞIYICI PROTEİN GENİ (SLC11A1-NRAMP1) POLİMORFİZMİNİN ROLÜ

NRAMP1 geni insanda 2. kromozomun q35 bölgesine yerleşik olup 550 aminoasitlik, 53 kDa büyüklüğünde bir integral membran proteini kodlamaktadır. İnfekte bireylerin makrofajlarının fagolizozomlarından demiri sitoplazmaya pompalayarak, fagolizozomlardaki bakterilerin gelişimi için esas olan demiri ortamdan uzaklaştırır ve hücre içi parazitlerin replikasyonlarını önler. Ayrıca makrofaj aktivasyon yolunda da önemli roller üstlenmektedir: CXC kemokin ( $\alpha$ -chemokine) regülasyonunu sağlar; IL-1b, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), MHCII molekülleri, TNF- $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) salınımını düzenler. Bu işlevlerinden dolayı NRAMP1'in otoimmün ve infeksiyöz hastalıklarda aday bir gen olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, NRAMP1'in işlevi üzerine etkili olabileceği düşünülen NRAMP1 gen polimorfizmlerinin Türk romatoid artrit ve tüberküloz hastalarındaki rollerinin araştırılması amaçlandı.

Bu kapsamda, 98 romatoid artrit, 112 tüberküloz hastası ve 213 sağlıklı kontrol grubunda NRAMP1 geninin 5' promotör bölgesi polimorfizmi DNA dizileme yöntemi ile, INT4, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ise hem ARMS-PZR hem de REA yöntemleri kullanılarak analiz edildi.

Çalışmamızda romatoid artrit ile NRAMP1'in 5' promotör, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri arasında anlamlı bağlantı bulunamazken (5' promotör polimorfizmi  $p=0.162$ , D543N polimorfizmi ve 3'UTR polimorfizmi  $p=0.130$ ), INT4 polimorfizmi arasında anlamlı bağlantı bulundu ( $p:0.005$ , %95 CI 1.20-2.77, O.R: 1.824). Tüberküloz ile NRAMP1'in 5' promotör, INT4, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri arasında anlamlı bağlantı bulunamadı (5' promotör polimorfizmi  $p=0.444$ , INT4 polimorfizmi  $p=0.337$ , D543N polimorfizmi ve 3'UTR polimorfizmi  $p=0.286$ ). Ayrıca romatoid artrit şiddeti ve tüberkülozun farklı klinik tipleri ile 5' promotör, INT4, D543N, 3'UTR polimorfizmleri arasında da anlamlı bağlantı bulunamadı. 3'UTR polimorfizmi ile D543N polimorfizmi arasında bağlantı dengesizliği belirlendi. D543N polimorfizmi bakımından A/A genotipine sahip bireylerde 3'UTR polimorfizmi bakımından delesyon/delesyon genotipine, G/A genotipi bulunan bireylerde delesyonsuz/delesyon genotipine ve G/G genotipine sahip bireylerde delesyonsuz/delesyonsuz genotipine sahip olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, Türk toplumunda tüberküloz ile NRAMP1 polimorfizmleri arasında bağlantı bulunamaz iken, romatoid artrit ile NRAMP1 geninin INT4 polimorfizmi arasında anlamlı bağlantı tespit edildi. INT4 Allel C'yi taşıyan bireylerin, bu alleli taşımayanlara göre 1.8 kat romatoid artrit hastası olma riskinin arttığı belirlendi. Bu verilere göre Türk romatoid artrit hastalarında Allel C'nin, hastalığın ortaya çıkmasında etkili bir faktör olabileceği düşünüldü.

## SUMMARY

### THE ROLE OF METAL ION CARRIER PROTEIN GENE (SLC11A1-NRAMP1) POLYMORPHISM IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND TUBERCULOSIS

In human NRAMP1 gene which encodes a 53kDa integral membrane protein consisting of 550 amino acids, is located on the q35 site of the 2<sup>nd</sup> chromosome. NRAMP1 pumps the iron ions from the phagolysosomes of the macrophages of infected individuals towards the cytoplasm; by this way it prevents the replication of intracellular parasites. Moreover it also plays important roles in the macrophage activation pathway: It maintains the regulation of CXC chemokine ( $\alpha$ -chemokine) and regulates the secretion of IL-1b, inducible nitric oxide synthase (iNOS), MHCII molecules, TNF-  $\alpha$  and nitric oxide (NO). Thus, NRAMP1 is considered to be a candidate gene for autoimmune and infectious diseases due to its' important functions.

This study aimed to investigate the roles of NRAMP1 gene polymorphisms that might affect NRAMP1 function in Turkish rheumatoid arthritis and tuberculosis patients.

In this context, 5' promoter region polymorphism of NRAMP1 gene was analyzed by DNA sequencing and INT4, D543N and 3' UTR polymorphisms were analyzed by using both of ARMS-PCR and REA techniques in 98 rheumatoid arthritis patients, 112 tuberculosis patients and 213 healthy control individuals.

Although a significant association was not detected between rheumatoid arthritis and the 5' promoter, D543N and 3' UTR polymorphisms of NRAMP1 gene (5' promoter polymorphism  $p=0.162$ , D543N polymorphism and 3' UTR polymorphism  $p=0.130$ ), a significant correlation was detected between the INT4 polymorphism and rheumatoid arthritis ( $p:0.005$ , %95 CI 1.20-2.77, O.R: 1.824). There was no significant association between tuberculosis and 5' promoter, INT4, D543N and 3' UTR polymorphisms (5' promoter polymorphism  $p=0.444$ , INT4 polymorphism  $p=0.337$ , D543N polymorphism and 3'UTR polymorphisms  $p=0.286$ ). In addition, no significant association were found between severity of rheumatoid arthritis, clinically different types of tuberculosis and 5' promoter, INT4, D543N and 3'UTR polymorphisms. A linkage disequilibrium was detected between the 3' UTR and D543N polymorphisms. Individuals with A/A, G/A and G/G genotypes of D543N polymorphism were found to have deletion/deletion, nondeletion/deletion and nondeletion/ nondeletion genotypes of 3' UTR polymorphism, in sequence.

As a result, while no association was detected between tuberculosis and NRAMP1 polymorphisms, INT4 polymorphism of NRAMP1 gene was found to be significantly correlated with rheumatoid arthritis. Risk ratio for being a rheumatoid arthritis patient was found to increase by 1.8 fold in individuals carrying the INT4 allele C when compared to the others that do not carry this allele. According to these data, allele C is thought to be an important factor for the out come of rheumatoid arthritis in Turkish rheumatoid arthritis patients.

## 1. GİRİŞ

Otoimmün bir hastalık olan ve etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamayan romatoid artrit (RA)'in görülme sıklığı toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte yaklaşık olarak her yüz kişiden birini etkilemektedir. Yaşam süresini 3-10 yıl arasında azalttığı bilinen RA'de günümüzde uygulanan tedaviler hastalığı ortadan kaldırmamakta sadece kişilerin yaşam kalitesini arttırmaktadır. Daha etkin tedavilerin uygulanabilmesi için hastalığın etiyolojisinde rol alan faktörlerin belirlenmesine gereksinim duyulmaktadır.

İnfeksiyöz hastalıkların biri olan tüberküloz her yıl dünyada 3 milyon insanın ölümünden sorumlu tutulmaktadır. İlk ortaya çıkışından çok uzun yıllar sonra insanoğlunun kontrol altına alabildiği bu hastalık, günümüzde hala halk sağlığını tehdit eden bir unsur olarak önemini korumaktadır. Son yıllarda AIDS'in dünyada hızla yayılmasına paralel olarak tüberkülozunda hızlı bir yayılım gösterdiği gözlenmektedir. Özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın olarak görülen tüberküloz, her ne kadar henüz AIDS gelişmiş ülkelerdeki boyutta ülkemizde görülmesede, ülkemizde de başlı başına önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gerek tüberküloz gerekse RA'da etkin tedavilerin gerçekleştirilebilmesi için bu hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olan çevresel ve genetik nedenlerin belirlenmesi önem taşımaktadır.

İnfeksiyöz ve otoimmün hastalıkların etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen genetik faktörlerden biri de Metal İyonu Taşıyıcı Protein (SLC11A1-NRAMP1) genidir [1]. İşlevsel olarak infeksiyon hastalıklara karşı savunmada rol oynadığı özellikle hayvanlarda ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur [2]. Savunma mekanizmasında rol almasının yanı sıra, makrofaj aktivasyon yolunda da önemli roller üstlenmektedir [3]. NRAMP1 geninin fonksiyonu göz önüne alındığında, bu gendeki polimorfizmlerin kişiler arasındaki hastalıklara yatkınlık/direnç göstermedeki farklılıktan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda genetik değişikliklere ilave olarak coğrafya, iklim, kültür, ekonomi, beslenme alışkanlığı farklılıklarının da eklenmesiyle hastalıkların görülme sıklığı toplumlara özgü olarak da değişkenlik göstermektedir.

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte, önümüzdeki yıllarda kişilere özgü reçetelerin yazılabileceği varsayılmaktadır. Bu aşamanın ön basamağı olarak, toplumlara özgü olarak değişkenlik gösteren hastalıklara yatkınlık ya da dirençten sorumlu olabileceği düşünülen aday genlerdeki değişimlerin frekanslarının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, etnik gruplar ve ırklar arasında değişkenlik gösteren ve NRAMP1 işlevi üzerinde etkili olabileceği düşünülen NRAMP1 gen polimorfizmlerinin Türk toplumunda romatoid artrit ve tüberküloz hastalığındaki olası rollerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda, romatoid artrit ve tüberküloz hastalığı ile NRAMP1 polimorfizmleri arasındaki bağlantının saptanması amacıyla 98 romatoid artrit, 112 tüberküloz hastası ve 213 sağlıklı kontrol grubunda NRAMP1 gen polimorfizmlerini belirleme çalışması gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında, romatoid artrit, tüberküloz ve sağlıklı kontrol grubundan alınan kanlardan genomik DNA izolasyonu yapılarak, NRAMP1 işlevi üzerinde etkili olabileceği düşünülen NRAMP1 geninin 4 farklı polimorfik bölgesi analiz edildi. Bu değişim bölgelerinden, genin 5' promotor bölgesindeki polimorfizmi analiz etmek için DNA dizileme yöntemi kullanıldı. Genin 4. intronundaki ve 15. eksonundaki tek nükleotid polimorfizmlerini ve 3'UTR (translasyonu yapılmayan bölge) bölgesindeki 4 nükleotidlik delesyon polimorfizmini belirlemek için ARMS-PZR (Allele Özgü Oligonükleotidlerle Mutasyon Belirleme) yöntemi kullanıldı. ARMS-PZR yönteminin doğruluğunu test etmek amacıyla, bu üç polimorfizm aynı zamanda REA (Restriksiyon Enzim Analizi) yöntemi ile de analiz edildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapıldı. Türk toplumunda RA ve tüberküloz hastalığı ile NRAMP1 polimorfizmleri arasındaki bağlantılar belirlendi.

Bu çalışma, romatoid artrit ve tüberküloz patogenezi ve konak savunmasında kullanılan mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunacağı gibi, ilaç geliştirilmesinde yeni farmakolojik hedeflerin ortaya konulmasında, yeni ve etkinliği daha yüksek olan aşuların geliştirilmesinde de yardımcı olacaktır. Romatoid artrit ve tüberküloza yatkınlık üzerine etkili olan genetik faktörlerin, farklı populasyonlarda değişkenlik göstermesi

nedeniyle, bu faktörlerin çeşitli populasyonlarda belirlenmesi bu gelişmeleri hızlandıracaktır. Riskli grupların ortaya konması, davranış şekilleri, seyahat alışkanlıkları, proflaktik ilaç kullanımı ve aşı uygulamalarında yeni yaklaşımların belirlenmesini sağlayabilecektir.

## **2. GENEL KISIMLAR**

### **2.1. ROMATOİD ARTRİT**

Romatoid artrit, ana belirti ve bulguları eklemlerde görülen, etiyolojisi bilinmeyen, kronik ve sistemik bir hastalıktır. Romatoid artritte birden çok eklem simetrik olarak tutulur ve tutulan eklemlerin biçimleri zamanla bozulur. Hastalık olarak morbiditesi (hastalığın etkinliği) yüksek olmakla birlikte, mortalitesi (ölüm) çok seyrek [4]. Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle beraber, etiyolojisinde birden çok faktörün birlikte etkili olduğu görüşü kabul edilmektedir [5].

#### **2.1.1. Romatoid Artrit Tarihçesi**

Literatürde RA'ya ilk olarak 19. yüzyılın ortalarında (Garrod, 1859) rastlanır. Bu tarihten önceki tıp yayınlarında RA'ın izine rastlanmaz. Kutsal kitaplarda, mısır mumyalarında ve insan vücudunu en ince ayrıntılarına kadar belirtmekle ün yapan Rönesans dönemi sanatçılarının resim ve heykellerinde RA'ın yaptıklarına benzer biçim bozukluklarına rastlanılmamıştır. Tüm bunlar, oluş nedeni bilinmeyen romatoid artrit etkeninin endüstrileşme ile ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmekle birlikte, bu görüşte bir varsayımdan ileri gidememektedir [4].

#### **2.1.2. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi**

Romatoid artrit prevalansı (görülme sıklığı) kullanılan tanı kriterlerine bağlı olarak değişir. 1987'de yeniden düzenlenen 'Revised American Rheumatism Association' (ARA) tanı kriterlerine (Tablo 2.1) dayanılarak yapılan çalışmalarda, prevalansın erişkin popülasyonda % 1-2 arasında değiştiği gösterilmiştir. RA prevalansı yaşla birlikte artar. Kadın erkek oranı 3/1'dir. Ancak ileri yaşlarda bu oranın eşitlendiği bildirilmektedir [5].

Tablo 2.1. ARA Tanı Kriterleri

Romatoid Artrit Kriterleri
1. Sabah sertliği: Eklem ve çevresinde 1 saatten fazla süren sabah sertliği
2. En az üç eklemde artrit: En az üç eklemde hekim tarafından kaydedilen yumuşak doku şişliği veya sinoviyal sıvı artışı ile beraber olan artrit
3. El eklemlerinde artrit: El bileği, el parmakları eklemlerinin en az birinde artrit
4. Simetrik artrit: Vücudun iki yarısında aynı bölgedeki eklemlerin aynı anda tutulması
5. Romatoid nodüller: Kemik çıkıntıları üzerinde veya eklemlerin çevresinde hekim tarafından gözlenen deri altı nodülleri
6. Romatoid Faktör (RF): Normal kontrollerde görülme sıklığı %5'den daha az olan serum RF pozitifliği
7. Radyolojik değişiklikler: El ve bilek radyografisinde erozyonlar

RA prevalansı coğrafi bölgelere veya iklim kuşaklarına göre değişmemekle birlikte, bazı ırklarda farklılıklar göze çarpmaktadır. Bunun altında yatan etkenin, genetik farklılıklar ve infeksiyöz ajanlar gibi hastalık etiolojisinde suçlanan bazı faktörler olduğu düşünölmektedir [6].

### 2.1.3. Romatoid Artrit Etiyolojisi

Romatoid artrit keskin nedeni bilinmemektedir. Günümüzdeki yaygın olan görüş, hastalığın aslında tek bir nedeninin olmadığı ancak, genetik olarak yatkın kişilerde pek çok artritöjen ajanlarla başlayabildiği yönündedir. Bugüne kadar etiolojisinde rol oynadığı düşünölen belli başlı faktörler; infeksiyöz ajanlar, genetik nedenler, immun sistem bozukluğu, travma, stres, cinsiyet, endokrin, metabolik, çevresel, beslenme ve psikososyal faktörlerdir [5,7,8].

İnfeksiyöz Ajanlar: Etiyolojide en çok üzerinde durulan konu infeksiyöz ajanlardır. Ancak bugüne kadar elde edilen bilgiler, etiyolojideki rollerini kesin olarak kanıtlamada yetersiz kalmıştır. Şimdiye kadar RA'lı hastaların kanından, eklem sıvı veya dokularından bir mikroorganizma üretilememiştir [9].

- Viral Ajanlar: Virüslerin immun cevapları deđiőtirme, deneysel olarak artrit oluşturma özellikleri ve viral orijinli bazı infeksiyonların RA klinik ve patolojisini taklit etmesinden dolayı, virüsler hastalık etiolojisinde rol aldığı düşünölen belli başlı ajanlardandır. Etiyolojide rolü olduğu düşünölen virüsler

arasında Human T-cell lenfotrofik virüs tip-1, Epstein Barr Virüsü (EBV), Hepatit B Virüsü (HBV), Rubella ve Parvovirüs B19 sayılabilir [2,4,5]. EBV'ye ait 'gp110' adlı proteinle HLADR4 'Human Leukocyte Antigen' antijenik bağlanma bölgesi arasında 5 amino asitlik çapraz reaksiyon bulunmaktadır. Ortak epitopu taşıyan hastaların bu çapraz reaksiyon nedeniyle EBV'ye tolerans gösterdikleri ve bu toleransın hastalık etyopatogenezini etkilediği öne sürülmektedir [9,10,11].

- Bakteriyel Ajanlar: *Streptococcus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacteria*'nın etiyolojide rolü olduğu düşünülmüş ancak, yapılan hiçbir çalışmada rolleri kanıtlanamamıştır. *Mycoplasma*'nın deneysel olarak artrit oluşumunu tetikleyebilmesi nedeniyle bu ajanın RA etiyolojisinde rolü araştırılmış ancak, hastalara ait doku örneklerinde mikroorganizma hiçbir zaman gösterilememiştir. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda *Mycobacteria tuberculosis* antijenlerinin, kıkırdak proteoglikanlarıyla çapraz reaksiyon yaptığı gösterilmiştir. *E.coli*'nin dnaj proteini ile HLADR4 arasında çapraz reaksiyonun bulunduğu ortaya konmuştur [8,12]. Bir başka hipoteze göre RA, standart yöntemlerle saptanamayacak ölçüde yavaş ve kronik bir bakteriyel enfeksiyondur ve özellikle histopatolojik bulgular ve çeşitli mikobakteri antijenlerine karşı immun yanıtlardaki artışlar bir mikobakteri enfeksiyonunu düşündürmektedir. Stres altındaki mikobakterilerden salgılanan ve diğer proteinlerinin üç boyutlu yapılarını denatürasyona karşı koruyan 65kD'luk mikobakteriye ait stres proteinine (SP65) karşı RA'da özellikle sinoviyal T ve B hücre yanıtları artmıştır. SP65'in 180-188'inci amino asitleri arasında kalan bölge ile bir insan kartilaj bağlantı proteini arasında amino asit homolojisi bulunmaktadır. Bu homolojinin RA'lı hastalarda artan T ve B hücre yanıtının nedeni olduğu bildirilmektedir [9,13,14].

RA'da kritik bir otoantijene karşı duyarlılığın primer olay olması ihtimali üzerinde de durulmaktadır. Bu otoantijenler arasında değişikliğe uğramış immunglobülinler (Ig), tip II kollajen ve proteoglikanlar sayılabilir [8]. RA'da hastalığın kronikleşmesinden sorumlu olabilecek, özellikle eklemlere özgü otoantijenlerin varlığı öne sürülmektedir. RA'da periferik kan mononükleer hücreleri fazla miktarda immunglobülin sentezlerler. İmmünglobülin sentezi ile T hücre aktivasyonu arasında güçlü bir korelasyon vardır ve

RA'da B hücre aktivasyonunun T hücre kaynaklı sitokinlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Miktarları az da olsa interlekin-2 (IL2), IL-4 ve IL-6, artmış B hücre aktivitesinden sorumlu olabilirler. RA'da IgM, IgG, IgA ve Romatoid Faktör (RF) yapımı vardır ve bu RF'ler serumda IgG'lere bağlanırlar. İmmün kompleksler oluşturabilen RF'lerin romatoid nodül, vaskülit ve artrit sorumlu olduğu düşünülmektedir [9].

#### **2.1.4. Romatoid Artrit Genetiği**

RA'da genetik faktörlerin katkısının olduğunu gösteren veriler epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmiştir. RA'lı hastaların birinci derece yakınlarında hastalık gelişme riskinin arttığı bilinmektedir. Hastaların kardeşlerinde RA görülme riski 2-17 kat artmaktadır. İkizlerde yapılan çalışmalarda konkordansın, monozigotik ikizlerde % 12-15, dizigotik ikizlerde % 3.5 civarında olduğu bulunmuştur. Hastalığın prevalans oranı arttıkça konkordans oranı artacağından, prevalanstan bağımsız bir ölçüt olan kalıtımsallık analizine göre, RA'nın kalıtımsallığının % 60 oranında olduğu hesaplanmıştır [15]. Hastalığa genetik yatkınlıkta rol alabileceği düşünülen sitokin genleri, hücre içi iletişim ve programlanmış hücre ölümü ile ilgili genler ve matriks yıkımından sorumlu enzimleri kodlayan genler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır [16]. Bu çalışmalar kapsamında metal iyon taşıyıcısı protein 1 (NRAMP-1), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, TNF, TNF reseptörü I ve II, Kortikotropin Serbestleştirici Hormon (CRH) genlerindeki değişimlerle RA arasında farklı çalışma serilerinde değişik oranlarda bağlantılar tespit edilmiştir [9,16].

##### *2.1.4.1. HLA (Human Lökosit Antijeni) Bölgesi*

RA'ya genetik yatkınlığın yaklaşık % 30-50'sinden HLA bölgesi sorumludur. Bununla beraber, HLA ile RA arasındaki ilişkinin özellikleri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. RA ile HLADR4 alleli arasındaki ilişki, bu bölgede tanımlanan en güçlü ilişkidir. Bununla beraber, RA ile DR4 arasında anlamlı bağlantı bütün etnik gruplarda gösterilememiştir. RA ile ilişkili farklı HLADR allellerinin 70.-74. pozisyonlarda korunmuş 5 amino asitin oluşturduğu ortak epitop olarak isimlendirilen bölgenin, RA'da genetik yatkınlığa neden olabileceği düşünülmektedir [17].

HLADR dışında RA ile ilişkili allellerle bağlantı dengesizliği gösteren veya bağımsız olarak genetik yatkınlığa katkıda bulunan diğer alleller henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [9,17,18].

#### 2.1.4.2. Sitokinler (TNF, TNF reseptörü I ve II, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10)

TNF sitokin ailesinin bir üyesi olup, en az 20 peptitten oluşmaktadır. İnsan TNF molekülü 233 amino asitlik 26kDa büyüklüğünde bir proteindir. B, T hücreleri, bazofiller, eozinofiller, dentritik , NK, nötrofiller ve mast hücreleri gibi immun hücreler ve astrositler, fibroblastlar, nöronlar, osteoblastlar gibi pek çok immun olmayan hücreler tarafından sentez edilirler. TNF molekülünün, çeşitli tipteki bir çok hücrenin büyümesini, farklılaşmasını ve metabolizmasını kontrol etmek, kanserli ve infekte hücrelerde apoptozisi ve inflamasyonu başlatmak gibi işlevleri olmakla birlikte, TNF'nin birincil işlevi immun sistemin tetiklenmesidir ancak aşırı üretimi inflamasyona, doku ve organ hasarına yol açmaktadır. TNF molekülünün TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere yapısal olarak birbirlerinden farklı transmembran ve glikoprotein yapıda iki reseptörü bulunmaktadır [19]. TNF genleri ve reseptörlerindeki çeşitli polimorfizmler, bunların transkripsiyonlarını dolayısıyla immun sistemin regülasyonunu değiştirebilme potansiyeline sahiptirler. Bugüne kadar TNF reseptörlerinde -609, -580, -383, 196 polimorfizmleri ve TNF genlerinde (CT)n (CA)n tekrar bölgeleri, -238G, -308, -376, -419 ve daha nadir görülen -1031, -863, -857 bölgeleri ile RA arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda değişken değerler bulunmuştur. Bazı çalışmalarda RA ya da şiddeti ile polimorfizmler arasında bağlantı kurulur iken, bazı çalışmalarda da bunun tersi sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda da TNF polimorfizmleri ile MHCI ve MHCII grup genleri arasında bağlantı dengesizliği bulunmuş ve hastalıkla TNF polimorfizmleri arasındaki bağlantı MHC ile olan bağlantı dengesizliği ile ilişkilendirilmiştir [20].

Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL1 geni RA'lı hastaların serumlarında, sinoviyal sıvılarında ve dokularında yüksek oranda anlatım yapar. IL6 ve TNF ile birlikte eklem hasarında rol oynadığı düşünülmektedir. IL1 ailesinin IL1- $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve IL1 reseptör antagonisti olmak üzere 3 üyesi bulunmaktadır. IL1- $\alpha$ 'da -889, IL1 $\beta$ 'da -511 ve IL1 reseptör antagonistinin 2. intronundaki tekrar polimorfizmleri ile RA arasında yapılan

farklı bağlantı çalışmalarında farklı oranlarda anlamlılıklar ve anlamsızlıklar tespit edilmiştir [21].

NK hücrelerinin büyümesini ve sitolitik aktivasyonlarını ve B hücre çoğalımında rol alan IL2 molekülünün 3' bölgesindeki dinükleotid tekrar bölgesi, -384, 114 ve IL-2 reseptörlerindeki polimorfizmlerle RA arasındaki ilişkinin ortaya konulması amacıyla yapılan çalışmalarda ya çok sınırlı bağlantılar bulunmuş ya da hiç bağlantı bulunamamıştır [22].

RA için potansiyel aday olabileceği düşünülen IL3 genindeki -16, 131 polimorfizmleri ile de sınırlı bağlantı gösterilmiştir [23].

Antiinflamatuvar olan IL4 proinflamatuvar sitokinlerinin üretimini azaltmakta ve eklem hasarında azalma sağlamaktadır. IL4'ün -590, ve 3. intronundaki tekrar dizi polimorfizmi ile RA arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışma serilerinde değişken bağlantılar ortaya konmuştur [24,25].

Anti-inflamatuvar olan IL10 geni oldukça polimorfik olup, özellikle -1082, -819, -592, -2849 bölgelerindeki polimorfizmler ile RA arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur [26].

#### *2.1.4.3. Kortikotropin Serbestleştirici Hormon (CRH)*

CRH organizmaların strese karşı verdikleri cevapta rol oynar, böylece immun olaylarda ve inflamasyonun kontrolünde önemlidir. RA hastalarında hastalığın aktivitesi kortizol sekresyonu ile ilişkilidir. RA hastalarında ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda düşük miktarda CRH'nin kortizol cevabının yetersiz kalmasına ve böylece anormal inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir. CRH'nin regülasyonu IL1, IL2, IL6, TNF gibi çok sayıda inflamatuvar sitokinler tarafından gerçekleştirilir. CRH geninde bulunan -1273, -225 polimorfizmleri ile RA arasında değişik çalışma serilerinde farklı değerlerde bağlantılar saptanmıştır [27].

## 2.2. TÜBERKÜLOZ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis complex* olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip kronik, nekroz oluşturan bir enfeksiyondur [28]. Hastalığın oluşumundan %97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. 1882 yılında etkenin (*M. tuberculosis*) bulunmasına, 1921 yılında bir aşının geliştirilmesine ve 1950'li yılların ortalarından beri etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına karşın tüberküloz, tüm dünyada, özellikle de yoksul ülkelerde, önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmektedir [29,30].

### 2.2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Tüberküloz, geçmiş insanlık tarihi kadar eskilere dayanan ve insanlıkla iç içe bir enfeksiyon hastalığıdır. Geçen binlerce yıllık süre içinde insidansında ( Bir toplumda 1 yıl içinde bulunan yeni vakaların oranında) artış ve azalmalarla seyretmiş ve halk sağlığı açısından kalıcı bir tehdit olma özelliğini her zaman sürdürmüştür [31]. Geçmişte çiçek, veba veya kolera gibi hastalıklarla birlikte bir çok dramatik salgınlara neden olan tüberküloz, günümüzde AIDS ile birlikte benzer bir salgın sergilemektedir [30].

İnsanların mikobakterilerle ilk karşılaşmasının MÖ 8000 yıllarında ilk yerleşik toplulukları oluşturması ve sığırları evcilleştirmesiyle birlikte olduğu tahmin edilmektedir. Almanya'da bulunan, MÖ 5000 yıllarına ait insan iskeletlerinde asit ve alkole dirençli basiller saptanmıştır. MÖ 700 yıllarına ait eski Çin kaynaklarında tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır. Robert Koch 1882'de tüberkülozun *M. tuberculosis* ile oluşan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlayarak yeni bir dönem başlatmıştır. 1930'lu yıllarda elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun varlığı saptanmaya başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar 1921 yılında ilk tüberküloz aşısını yani Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmişlerdir. Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem 1940'lı yıllarda streptomisin ve Para Amino Salisilik asit (PAS)'in bulunması ile başlamış ve bugün çoklu ilaç uygulamaları ile tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir [32].

### 2.2.2. Tüberkülozun Epidemiyoloji

Tüberküloz günümüzde en yaygın görülen enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan yaklaşık 1.7 milyar insan tüberküloz basili ile enfekte olup

bunların büyük çoğunluğunu geliştirmekte olan ülkelerdeki insanlar oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki infekte bireylerin %80'i 50 yaş ve üzerinde iken geliştirmekte olan ülkelerdeki bireylerin % 77'si 50 yaş ve altındakilerden oluşmaktadır. Tüm dünyada 20 milyondan fazla tüberküloz hastası bulunmakta olup, buna her yıl 8 milyon yeni hasta eklenmektedir. Bu verilere göre tüberküloz her yıl diğer infeksiyon hastalıklarının (AIDS, diyare, sıtma, diğer tropikal hastalıkların) yol açtığı toplam ölüm sayısından fazlasını tek başına gerçekleştirmektedir [33,34].

HIV infeksiyon pandemisi 1980'li yıllardan sonra hızlı artışı bugün bir çok ülkede tüberkülozlu hasta sayısının belirgin bir şekilde artmasına neden olmuştur. HIV epidemisi yayıldıkça ilaçlara dirençli tüberküloz sorunu da artmaya başlamıştır. Tüm dünyada 1994 ortasına kadar 5.6 milyon kişinin hem HIV hem de tüberküloz basili ile infekte olduğu bildirilmiştir. Tüm dünyadaki infekte kişilerin 2/3'ünün ve tüberkülozlu hastaların % 60'ının yaşadığı Asya ülkelerinde son yıllarda HIV infeksiyonunun giderek artıyor oluşu, önümüzdeki yıllarda tüberküloz sorununu giderek ağırlaştıracaktır. Gelişmekte olan ülkelerde özellikle Asya'da tedaviye alınan hastaların %50'den fazlası eksik ve yetersiz tedavi edilmekte, sonuçta hem kazanılmış direnç hem de primer direnç giderek artmaktadır. İki veya daha fazla ilaca dirençli basillerin, bu hastalar tarafından çevreye yayılması ile gelecek nesiller açısından tüberküloz tedavi edilemez bir hastalık tehdidi oluşturmaktadır [35].

#### *2.2.2.1. Türkiye'de tüberkülozun epidemiyolojisi*

Birinci dünya savaşının getirdiği yoksulluk koşulları nedeniyle hastalık Anadolu'ya yayılmış ve 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmıştır. 1940'lı yılların sonuna kadar tüberküloz en sık ölüm nedenidir. İlki 1953'te olmak üzere 1980'e dek 9 kez kitlesel aşılama kampanyası yapılmıştır [36].

1970'li yılların başında tüberkülozun artık kontrol altına alındığı şeklindeki görüşler, bu yıllardan sonra kamuoyu ve devletin tüberküloz savaşına ilgisini azaltmıştır. Nitekim 1977'den sonra yapılan çalışmalarda infeksiyon riskinin artmaya başladığı görülmüş, 1977-85 yılları arasında infeksiyon riskinin her yıl yaklaşık %7.2 oranında arttığı bildirilmiştir. Bulaşıcı karakterdeki tüberküloz hastalarının yetersiz tedavileri tüberküloz ölümlerini azaltmış fakat tam olarak tedavi edilmeyen hastalar hem infeksiyonun yayılmasına, infeksiyon riskinin artmasına ve infeksiyon havuzunun genişlemesine yol

açmakta, hem de ilaçlara dirençli kronik olguların sayısının artmasına yol açmaktadır. Bu koşullarda Türkiye’de henüz HIV ile ilgili tüberküloz formlarının ortaya çıkmaması büyük şanstır [29,37]. Türkiye de, insidansı 100 bin de 26 üzerine çıkmakta olup, hastalığın sık görüldüğü ülkeler arasında yer almaktadır. 2005 yılında 18753 yeni olgu bildirilmiştir [38].

### 2.2.3. Tüberküloz Genetiği

İnfeksiyon hastalıkları, binlerce yıldan beri insanlar için morbidite ve mortalitenin en önde gelen nedenlerinden olmasının yanısıra, insan evriminde belli polimorfizmlerin gelişmesi ve korunmasında da önemli seçici bir güç olmuştur [39].

Yıllardan beri infeksiyon hastalıklarının seyrinin bireyler arasında anlamlı farklar gösterdiği ve bazı infeksiyon hastalıklarının ailevi özelliği olduğu bilinmektedir. *M. tuberculosis* ile infekte olan bireylerin hemen hemen tamamında infeksiyon gelişmekle beraber, infeksiyonu geçirenlerin sadece %5-10 kadarında klinik hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Hastaların çok azında bir risk faktörü (Diabetes mellitus, ileri yaş, alkol bağımlılığı, HIV infeksiyonu, kortikosteroid kullanımı vb.) tespit edilmektedir. Son yıllara kadar bu farklılıktan sosyoekonomik durum, kalabalık yaşam ve gıdasızlık gibi çevresel faktörler sorumlu tutulmuştur. Ancak, özellikle son 10 yılda aile ve ikiz çalışmaları ile başlayan ve yeni moleküler yöntemlerin devreye girmesi ile çeşitlenerek devam eden sayısız çalışma, konağa ait genetik faktörlerin de en az çevresel faktörler kadar önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur [40].

*M.tuberculosis*, konak hücresi olarak makrofajları kullanmaktadır. Oluşturduğu infeksiyona karşı direnç, bakteri ile konağın bağışıklık sistemi arasında gelişen karmaşık ilişkilerin sonucudur. Bakterinin temizlenmesinde özellikle makrofajlar ve makrofaj fonksiyonu üzerine etkili olan sitokinlerin önemli rolü vardır [40]. İnterferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokinler, makrofajları aktive ederek tüberküloz direncinde önemli roller üstlenmekle beraber, hastalıkta ortaya çıkan doku hasarından da sorumlu tutulmaktadır. Makrofajlar, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri oluşturma, fagozomların asidifikasyonu, fagozomlarla lizozomların füzyonu ve fagozom içi demirin kısıtlanması gibi mekanizmaları devreye sokarak bakteri ile savaşır. Son zamanlarda, tüberküloza genetik yatkınlıkta rol alabileceği düşünülen HLA,

Vitamin D Reseptörü, MannoZ Bağlayan Lektin, TNF- $\alpha$  ve IL-1 geni üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır [40,41].

#### 2.2.3.1. HLA Bölgesi

HLA genlerinin hastalık üzerine etkisinin, T hücrelerinin antijen sunmadaki tipik işlevleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan alışmalar, klinik tüberküloz ortaya çıkışı ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili birkaç major genin varlığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmaların çoğunda HLADR2 (zellikle HLADRB1\*1501 ve HLADRB1\*1502) ile pulmoner tüberküloz gelişimi ve radyolojik olarak yaygın lezyonlarla seyreden ciddi hastalık tablosu arasında ilişki bulunmuştur. HLADR2, tüberkülozda ilaç direncinden de sorumlu tutulmaktadır. Tüberküloz gelişimi ile ilişkili bulunan diğer HLA allelleri, HLA-DQw1,HLADQB1\*0503, HLADQA1\*0101, HLADQB1\*0501, HLADQB1\*0601 ve HLADR1\*1501'dir. Tüberküloza konak duyarlılığını azaltan bazı ilişkiler de öne sürülmektedir. Bunlar arasında, HLADR3, HLADQw3, HLADQB1\*0402, HLADR4, HLADR8 ve HLADPB1\*04 allelleri yer almaktadır [42].

#### 2.2.3.2. Vitamin D Reseptörü

D vitamininin aktif metaboliti olan 1-25 dihidroksi vitamin-D3 (1,25D3), kalsiyum metabolizmasında önemli bir düzenleyici molekül olmasının yanısıra, bağışıklık sistemini düzenleyici önemli işlevleri de vardır. 1,25D3, monositleri aktive eder, hücre aracılı bağışıklığı düzenler, lenfosit proliferasyonu, immunglobulin ve sitokin sentezini baskılar. 1,25D3'n bu işlevine aracılık eden Vitamin D Reseptörü (VDR) geni, insanda 12. kromozomda lokalize olmuştur. VDR, monositler ve aktif T ve B lenfositler üzerinde bulunur. Yapılan alışmalar, VDR'nin insanlarda infeksiyon hastalıklarına duyarlılığı düzenleyen bir immun yanıt geni olabileceğini ortaya koymuştur [43].

VDR geninin 3' ucunda kodon 352, intron 8 polimorfizmleri ile tüberküloz arasında bağlantı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [44].

#### 2.2.3.3. MannoZ Bağlayan Lektin (MBL)

MBL, karaciğerde sentezlenen 96 kDa'luk bir akut faz proteini olup, doğal immun sistemin önemli bir elemanı olduğu kabul edilmektedir. MBL, pek çok şekere etkin bir şekilde bağlanabilen ve oldukça iyi korunmuş bir antikor olarak görev yapar. Bağlandığı şekerlerin çoğu memeli hücrelerinde yüksek yoğunlukta bulunmadığından memelilere ait şekerleri genellikle tanımaz, sıklıkla mikrobiyal hücrelerin yüzeyleri ile

iyi uyum gösterir. Bu hücrelerle bağlanması; fagositlerin MBL ile kaplanan bakterilere tutunması, bakterinin hücre içine alınması ve öldürülmesi ile sonuçlanmaktadır [45].

Dünyadaki en yaygın immün yetmezlik olan MBL eksikliği, çocukluk döneminde tekrarlayan çocukluk çağı infeksiyonlarına neden olmaktadır. MBL serum düzeyi gen mutasyonlarının varlığında anlamlı olarak azalmaktadır. Bugün, MBL yetmezliği ile ilişkili 3 yapısal mutasyon tespit edilmiştir. Kodon 54 ve 57'deki mutasyonlar proteinin sekonder yapısını bozar ve serum MBL düzeylerinin azalması ile ilişkilidir. Kodon 52'deki mutasyonun proteinin serum düzeyleri üzerine etkisi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, MBL mutant allelleri için hem homozigot hem de heterozigot olanlarda infeksiyon riskinin arttığını göstermektedir [46,47,48].

#### 2.2.3.4. Sitokinler (*TNF- $\alpha$* ve *IL-1*)

*TNF- $\alpha$* , birçok inflamatuvar ve immün sistem aracılı cevapta önemli rol oynayan bir sitokindir. Esas olarak, monosit, makrofaj, T ve B lenfositler veya mikrobiyal ürünlerle uyarılan diğer hücrelerden salınır. Bağışık cevabı oluşturacak sitokin kaskadının indüksiyonu için gereklidir [49,50]. *TNF- $\alpha$*  molekülünün bu etkilerine aracılık eden 2 reseptörü bulunmaktadır. *TNF- $\alpha$*  lokusunda tanımlanmış önemli polimorfizmler: *TNF- $\alpha$*  reseptörlerinde -609, -580, -383, 196 polimorfizmleri ve *TNF- $\alpha$*  genlerinde (CT)<sub>n</sub> (CA)<sub>n</sub> tekrar bölgeleri, -238, -308, -376, -419, ve daha nadir görülen -1031, -863, -857 bölgeleri ile tüberküloz arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda değişken değerler bulunmuştur [51,52,53].

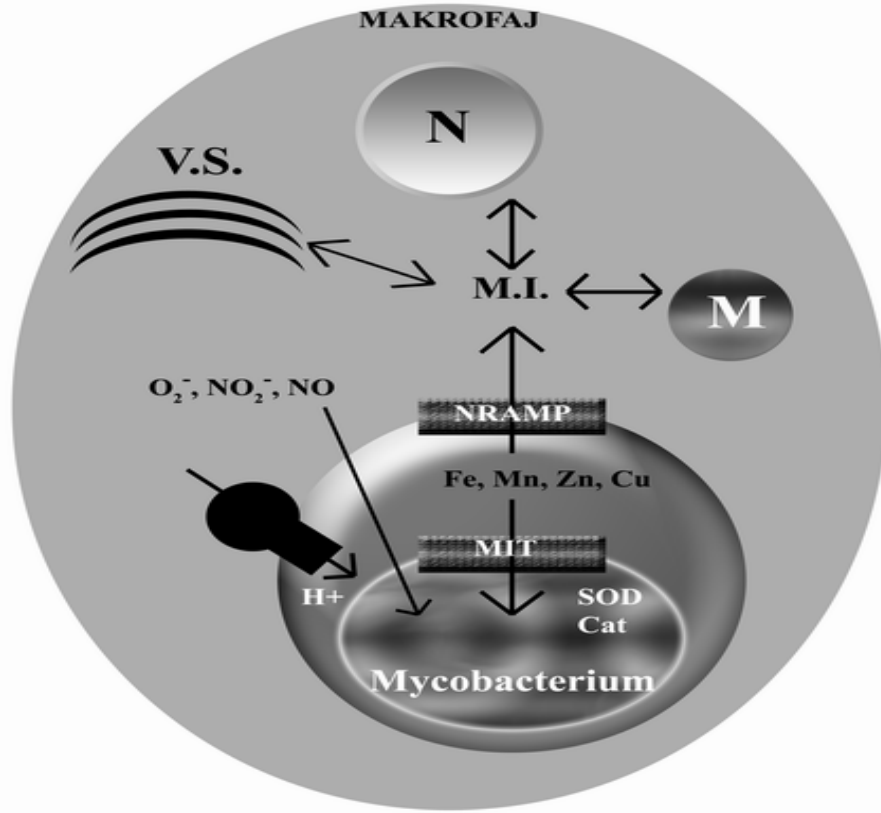
*IL-1* hem hümmoral hem de hücreyel immün cevabın ortaya çıkmasını sağlar. Nötrofil ve makrofajları stimüle eder, B hücre proliferasyonunu hızlandırır, hematopoiezisi uyarır, birçok sitokin ve inflamatuvar moleküllerin etkileşimlerine aracılık eder [54].

*IL-1b* geninde, -511 ve 3953 pozisyonlarında iki adet polimorfizm tanımlanmıştır. *IL-1b* A1 allelini taşıyan hastalarda *IL-1b* için mRNA ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur interlökin-1 reseptör a (*IL-1Ra*) geninde ise, 5 farklı allel ve 2-6 adet 86 bç'lik ardışık tekrar polimorfizmi bulunmuştur. Genetik analizler, *IL-1Ra* allel A2'nin, *M.tuberculosis* infeksiyonuna cevap olarak daha yüksek düzeyde *IL-1Ra* üretimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu alleli taşıyanlar, taşımayanlardan 1.9 kat daha fazla *IL-1Ra* üretmektedir [55,56].

### 2.3. METAL İYONU TAŞIYICI PROTEİN (NATURAL RESISTANCE ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEİN, SLC11A1-NRAMP1) GENİ

Saf fare suşlarından bazılarının *Mycobacterium bovis* (BCG suşu), *M.lepraemurium*, *M.intracellulare*, *Salmonella typhimurium* ve *Leishmania donovani* infeksiyonlarına karşı doğal olarak dirençli olduğu, bu direncin farede 1. kromozom üzerinde yer alan Bcg (bacille Calmette-Guerin) lokusu tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Bcg için aday bir gen pozisyonel klonlama ile izole edilmiş ve Nramp-1 olarak isimlendirilmiştir. Nramp-1 dizi analizi infeksiyona duyarlılığın tek bir amino asit değişimine bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır [57]. Yapılan çalışmalar bu genin insandaki homologu olan ve 2q35 kromozom bölgesine yerleşik olan NRAMP1'in varlığını ortaya koymuştur. NRAMP1 geni metal iyonu taşıyıcı protein olması nedeniyle 'Solute Carrier Family 11 Member 1' (SLC11A1) olarak da adlandırılmaktadır [58].

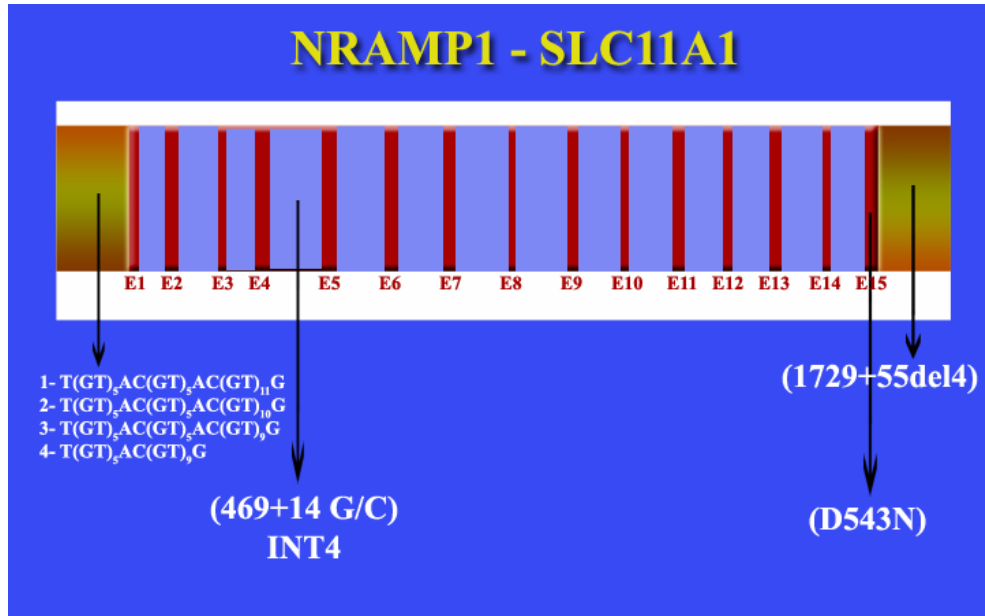
Onbeş eksondan oluşan ve 12 kb büyüklüğünde olan NRAMP-1 geni, 550 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır [59]. NRAMP-1 53 kDa'luk bir integral membran proteini olup, makrofajlarda endolizozomal kompartımanda yerleşiktir [3]. Kesin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, proton (H<sup>+</sup>) varlığında demir alınımını yönlendiren bir metal iyonu taşıyıcısı olarak görev yaptığı düşünülmektedir. İnfekte makrofajların fagolizozomlarından demiri sitoplazmaya pompalayarak, fagolizozomlardaki bakterilerin gelişimi için esas olan demiri ortamdan uzaklaştırır ve hücre içi parazitlerin replikasyonlarını önler. Aynı zamanda bakterilerin aktif oksijen bileşiklerine karşı kendini korumak için kullanacağı antioksidan savunma enzimleri (SOD, katalaz) için gerekli olan Zn, Cu gibi metallerin fagozomdan sitoplazmaya pompalanmasında da sorumludur [60,61,62] (Şekil.1). Ayrıca makrofaj aktivasyon yolunda da önemli roller üstlenmektedir: CXC kemokin ( $\alpha$ -chemokine) regülasyonunu sağlar; IL-1b, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), MHCII molekülleri, TNF- $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) salınımını düzenler [1,63]. NRAMP1'in nötrofil işlevi üzerindeki söz edilen bu rolleri Tüberküloz, Lepra gibi infeksiyöz hastalıklarla [2,64] ve Romatoid Artrit [65,66], Kawazaki [67], Primer Biliyer Siroz [68] hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarla bağlantılı olduğu fikrini desteklemektedir.



Şekil 2.1. Makrofaj-patojen etkileşiminde NRAMP1'in ve NRAMP1'in bakteride homoloğu olan metal iyon taşıyıcısı (MIT)'nin işlevleri. Makrofaj fagozomuna alınan infeksiyon ajanı bakteri, varlığını devam ettirebilmek için aktif oksijen bileşenleri ile mücadele eder. Bakteri, toksik ajanları nötralize edebilen katalaz ve süperoksit dismutaz gibi metallo enzimleri üreterek kendini korur. Metallo enzimleri üretmek için gerekli olan metal iyonlarını, metal iyon taşıyıcısı aracılığıyla makrofaj içindeki metallere karşılar. Makrofaj ise, metal iyon taşıyıcı proteini (NRAMP1) sayesinde bakteri için gerekli olan metal iyonlarını uzaklaştırarak savunmasını gerçekleştirir. N, nükleus; V.S, vakuoler sistem; M, mitokondri; M.I, metal iyonları; SOD, süperoksit dismutaz; Cat, katalaz [62].

İnsanda en fazla alveolar makrofajlarda ve periferik kan lökositlerinde anlatımı yapılan NRAMP-1 geninde sayıları 11'e varan değişim belirlenmiştir [69]. Bunların 5 tanesi ekson bölgelerinde, 3 tanesi intron bölgelerinde, 2 tanesi genin 3' transkripsiyonu yapılmayan bölgesinde ve 1 tanesi de 5' promotör bölgesindedir [1,59]. Bu değişimlerden genin transkripsiyon başlangıç noktasından 250-300 baz çifti öncesinde bulunan (GT)<sub>n</sub> tekrar polimorfizmi, 15. eksondaki tek nükleotid (D543N) polimorfizmi, 4. introndaki tek nükleotid (469+14G/C) polimorfizmi ve genin 3' anlatımı yapılmayan bölgesindeki 4 bazlık delesyon (1729+55del4) polimorfizminin hastalıkların gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.2). Z-DNA formu meydana getiren (GT)<sub>n</sub> allellerin genin farklı düzeylerde anlatım yapmasından sorumlu olduğu

bildirilmektedir [59]. Bu bölgede, gen ekspresyonunu yönlendirme yetenekleri açısından farklı alleller tanımlanmıştır. Bu allellerden allel 1, 2 ve 4 zayıf promotor özelliğinde, allel 3 ise kuvvetli promotor özelliğindedir. Genel olarak toplumlarda yaklaşık olarak allel 2 % 25, allel 3 % 75 oranlarında bulunur iken, diğer allellerin sıklığı % 0.001'dir. 15.eksondaki değişimin, aspartik asit yerine asparagin oluşmasına neden olarak protein fonksiyonunu ve böylece makrofaj fonksiyonunu değiştirdiği düşünülmektedir [58,59]. Genin 3' anlatım yapılmayan bölgesindeki delesyon polimorfizminin ise fizyolojik etkisi bilinmemekle birlikte, pek çok genin 3' bölgesinde düzenleyici elementler bulunduğundan dolayı önemlidir. 4. intronda alternatif kırılma noktası bulunduğundan dolayı da bu bölgedeki polimorfizmin farklı büyüklüklerde ürün oluşumundan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir [1,67].



Şekil 2.2. NRAMP1 geninin analiz edilen polimorfik bölgeleri

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMA GRUBU

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Romatoloji Ana Bilim Dalı'nda tedavilerini sürdüren, romatoid artrit tanısı konulmuş 98 hastadan, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda tüberküloz tanısı konulmuş ve tedavileri sürdürülen 112 hastadan, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nin kliniklerine başvuran tüberküloz olmayan 80 sağlıklı bireyden ve otoimmün bir hastalığı olmayan 133 sağlıklı bireyden (toplam 423 birey) EDTA'lı tüplere 5'er ml kan örnekleri alındı. Kontrol grubu yaş ve cinsiyet özelliklerinin, hasta ve kontrol grubunda eşit oranlarda olması sağlandı. Romatoid artrit hastalarının klinik özellikleri Tablo 3.1'de, ve Tüberküloz hastalarının klinik özellikleri Tablo 3.2'de verilmektedir. Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 06.04.2004 tarihinde 7743 sayılı onay alındı. Çalışmanın tamamı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarında yapıldı.

Tablo 3.1. Romatoid Artrit ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Çalışma Grubunun Özellikleri	RA Grubu		Kontrol Grubu	
Yaş (Ortalama)	50.84 ± 12.3		57.1±6.1	
Cinsiyet	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
Sayı (Oran)	78 (%80)	20	106 (%80)	27
Hastalarda Erozyon Bulunması	+	-		
Sayı (Oran)	51 (%69)	23		
RF (Romatoid Faktör) Pozitifliği	+	-		
Sayı (Oran)	58 (%63)	34		

Tablo 3.2. Tüberküloz ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Çalışma Grubunun Özellikleri	Tbc Grubu		Kontrol Grubu	
Yaş (Ortalama)	46.34 ± 11.4		53.1±7.27	
Cinsiyet	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
Sayı (Oran)	42 (%38)	70	30(%38 )	50
Tüberküloz (Tbc) Tipi	Akciğer Tbc	Akciğer dışı Tbc		
Sayı (Oran)	86 (%77)	26		

### 3.2. YÖNTEM

#### 3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada, romatoid artrit (98 kişi) ve tüberküloz (112 kişi) tanısı konulmuş hastalardan ve sağlıklı bireylerden (213 kişi) 5 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan materyalleri kullanıldı. 15 ml'lik tüpte 1.5 ml EDTA'lı kan ve 5 ml soğuk eritrosit parçalama tamponu iyice karıştırılarak, 15 dakika buzda bekletildi. İnkübasyon sonrası tüp 4 °C'da 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak, çökelti 2 ml eritrosit parçalama tamponu ile süspansiyon edildi. Süspansiyon 4 °C'da 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Çökelti 0.5 ml hücre çekirdeği parçalama tamponu eklenerek iyice karıştırıldı ve daha sonra tüpe 80 µl steril distile su, 6 µl proteinaz K (20mg/ml), ve 10 µl %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) (w/v) (Tablo 3.3) ilave edilerek 37 °C'lik su banyosunda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, karışıma 360 µl 9.5M amonyum asetat eklenerek iyice karıştırıldı ve 4 °C'da 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. DNA'yı içeren üst sıvı yeni bir 15 ml'lik tüpe aktarıldı ve 2 hacim saf etil alkol eklenerek DNA'nın iplikçik halinde çökmesi sağlandı [70]. Çöken DNA mikropipet ucu ile steril 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Tüpteki alkolün uçması beklendikten sonra 150 µl steril distile suda çözüldürüldü.

Tablo 3.3. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

TAMPON/SOLÜSYON ADI	İÇERİK
Eritrosit Parçalama Tamponu pH=7.4	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0.1mM Na <sub>2</sub> EDTA
Hücre Çekirdeği Parçalama Tamponu pH=8.0	100mM NaCl 25mM Na <sub>2</sub> EDTA
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	% 10 SDS
Amonyum Asetat Çözeltisi	9.5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>

### 3.2.2. DNA'nın Kalitatif Tayini

0.5 g agaroz, 50ml 0.5XTEB içerisinde kaynatılarak çözündürüldü, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 2.5µl EtBr (10mg/ml) eklendi. Sıvı haldeki jel, agaroz jel elektroforez kabına dökülerek donmaya bırakıldı. 1-2µl DNA, toplam hacim 4µl olacak şekilde 6xükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 0.5XTEB tamponu (Tablo 3.4) içerisinde, 120 V'da 30 dakika yürütüldükten sonra jel UV altında incelendi ve genomik DNA'nın kalitesi analiz edildi.

Tablo 3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonu

TAMPON/SOLÜSYON ADI	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
5X (TEB) Tamponu (pH=8.0)	Trizma baz	445 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
	Borik asit	445 mM
Elektroforez Yükleme Solüsyonu	Bromofenol mavisi	2.5 mg/ml
	% 10 SDS	%1 (w/v)
	Gliserol	% 87 (v/v)

### 3.2.3. DNA'nın Kantitatif Tayini

Kandan izole edilen DNA'ların derişimleri, 260nm dalga boyunda okunan OD değerinin, sulandırma katsayısı ve DNA katsayısı ile çarpılması sonucu µg/ml cinsinden belirlendi. 260nm/280nm değeri, izole edilen DNA'nın saflığının bir ölçüsü olup, 1.8 değerinde DNA'nın saf olduğu kabul edilmektedir.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (katsayı)}$$

### 3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu çalışmada, NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesindeki dinükleotid tekrar polimorfizmini (GT)<sub>n</sub>, 4. introndaki tek nükleotid polimorfizmini (INT4G/C), 15. eksonundaki tek nükleotid polimorfizmini (D543N) ve translasyona uğramayan bölgesindeki 4 bazlık delesyon polimorfizmini (3'UTR del4) belirlemek amacıyla, genin bu değişimleri kapsayan bölümleri uygun primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. D543N ve 3' UTR polimorfik bölgelerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle, restriksiyon enzim kesimi için 244 bç'lik ürün oluşturan tek bir PZR yapıldı.

#### 3.2.4.1. Allele Özgü Nükleotidlerle Mutasyon Belirleme Tekniği (Allele Refractory Mutation Detection System, ARMS)

Bu teknikte allelleri belirlemek için, aynı koşullarda iki farklı tüpte PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. Her iki tüpteki PZR karışımları arasındaki tek fark, kullanılan primer çiftlerinin, çalışılan bölge için allellere özgü olarak tasarlanması ve sadece hedeflenen allelin bulunması durumunda PZR reaksiyonunda ürün oluşturmalarıdır. Ürün oluşması allelin varlığını, ürün oluşmaması ise allelin bulunmadığını göstermektedir. Her iki tüpteki PZR reaksiyonu sonucu ürün oluşup-oluşmamasına göre de bireyin allel bakımından heterozigot ya da homozigot olup olmadığı belirlenmektedir [71].

Ayrıca her reaksiyon tüpünde bir çift de kontrol primer kullanılır. Bu kontrol primeri PZR reaksiyonunun çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için kullanılır ve tamamen farklı bir başka diziyi çoğaltacak olan bir çift primerdir.

Bu çalışmada, NRAMP1 geninin 15. eksonundaki tek nükleotid polimorfizmini, translasyona uğramayan bölgesindeki 4 bazlık delesyon polimorfizmini ve 4. introndaki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla, iki farklı tüpte değişim noktalarına özgü hazırlanmış primerlerin ve bir genel primerin kullanıldığı PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. Ayrıca kontrol primerleri olarak insan büyüme hormonu geninde 429 bç'lik bölgeyi çoğaltmak için tasarlanmış bir çift primer de aynı PZR reaksiyonunda kullanıldı.

### 3.2.4.2. Primerler

NRAMP1 geninin 5' promotor, D543N, 3'UTR ve INT4 bölgesindeki polimorfizmleri belirlemek için yapılan PZR'lerde, hedef gen bölgelerine özgün olarak kullanılan primerlerin ve kontrol primerlerinin isimleri ve dizileri Tablo 3.5'de verilmektedir.

Tablo 3.5. Primer İsimleri ve Baz Dizileri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ	ÇOĞALTILAN GEN BÖLGESİ (bç)	PRİMERİN BAZ SAYISI
Pro1	5'-ACT CgC ATT Agg CCA ACg Ag-3'	5'Promotor bölgesi 199bç	20
Pro2	5'-TT CTg TgC CTC CCA AgT TAG C-3'		21
eup1	5'- gCA TCT CCC CAA TTC Atg gT-3'	D543N ve 3'UTR bölgesi 244bç	20
eup2	5'- AAC TgT CCC ACg CTA TCC Tg-3'		20
3'UTRS1	5'-TgA CTg gCC TgC Tgg ATg T-3'	3'UTR bölgesi (ARMS-PZR) 103bç	19
3'UTRG	5'- gAA ACA gCA ggT CCC TAA Ag-3'		20
3'UTRS2	5'- gAC Tgg CCT gCT ggA gAg-3'		18
D543NS1	5'- TgT ATg ggC TCC TTg Aag Agg-3'	D543N bölgesi (ARMS-PZR) 190bç	21
D543NG	5'-gAA ACA gCA ggT CCC TAA Ag-3'		20
D543NS2	5'-gTA Tgg gCT CCT TgA AgA gA-3'		20
INT4S1	5'-ggT TCT CCC TgT CCA ggC-3'	INT4 bölgesi (ARMS-PZR) 166bç	18
INT4G	5'-CCT gCC TCC TCA CAg CTT CT-3'		20
INT4S2	5'-ggT TCT CCC TgT CCA ggg-3'		18
IKP1	5'-gCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	İnsanBüyüme Hormonu Geni (ARMS-PZR kontrolü) 429bç	21
IKP2	5'- TCA Cgg ATT TCT gTT gTg TTC C-3'		22

### 3.2.4.3. DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu

Bu çalışmada, kullanılan Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 5U/ $\mu$ l'dir. (Fermentas Life Sciences). PZR tamponu olarak ise MgCl<sub>2</sub> içermeyen 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 8.8) ve %0.8 Nonidet P40 içeren 10X tampon kullanıldı.

### 3.2.4.4. PZR Karışımları

Çalışmadaki PZR karışımları, literatür bilgilerinin değerlendirilerek bazı değişikliklerin yapılması sonucu gerçekleştirildi [72]. Tablo 3.6'da 5' promotor bölgesindeki tekrar polimorfizmini DNA dizi analizi yöntemiyle belirlemek amacıyla uygulanan, Tablo 3.7'de D543N ve 3'UTR bölgesindeki polimorfizmleri restriksiyon enzim analizi yöntemi ile belirlemek amacıyla uygulanan, Tablo 3.8'de D543N bölgesindeki polimorfizmi, Tablo 3.9'da 3'UTR bölgesindeki polimorfizmi ve Tablo 3.10'da INT4 bölgesindeki polimorfizmi ARMS-PZR yöntemiyle belirlemek amacıyla uygulanan PZR karışımları verilmektedir.

Tablo 3.6. 5' Promotor bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu$ l/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	18	-
10Xtampon	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	0.375mM
dNTP karışımı (25mM)	0.3	0.3mM
Primer pro1 (10pmol/ $\mu$ l)	0.8	0.8pmol
Primer pro2 (10pmol/ $\mu$ l)	0.8	0.8pmol
Taq polimeraz (5U/ $\mu$ l)	0.1	0.5U
DNA (150ng/ $\mu$ l)	1	150ng
Toplam hacim	25	

Tablo 3.7. D543N ve 3'UTR bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	18	-
10Xtampon	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	0.375mM
dNTP karışımı (25mM)	0.3	0.3mM
Primer eup1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer eup2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Taq polimeraz (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5U
DNA (150ng/ $\mu\text{l}$ )	1	150ng
Toplam hacim	25	

Tablo 3.8. D543N bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	16.8	-
10Xtampon	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	0.375mM
dNTP karışımı (25mM)	0.3	0.3mM
Primer D543NS1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer D543NG (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer D543NS2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer IKP1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Primer IKP2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Taq polimeraz (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5U
DNA (150ng/ $\mu\text{l}$ )	1	150ng
Toplam hacim	25	

Tablo 3.9. 3'UTR bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	16.4	-
10Xtampon	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	0.375mM
dNTP karışımı (25mM)	0.3	0.3mM
Primer 5UTRS1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer 5UTRG (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer 5UTRS2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer IKP1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Primer IKP2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Taq polimeraz (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5U
DNA (150ng/ $\mu\text{l}$ )	1	150ng
Toplam hacim	25	

Tablo 3.10. INT4 bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	16.4	-
10Xtampon	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	0.375mM
dNTP karışımı (25mM)	0.3	0.3mM
Primer INT4S1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer INT4G (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer INT4S2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.8	0.8 $\mu\text{mol}$
Primer IKP1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Primer IKP2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )	0.2	0.2 $\mu\text{mol}$
Taq polimeraz (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5U
DNA (150ng/ $\mu\text{l}$ )	1	150ng
Toplam hacim	25	

### 3.2.4.5. PZR Programları

Tablo 3.11’de NRAMP1 geninin 5’ promotor bölgesinin çoğaltımında kullanılan PZR programı, Tablo 3.12’de restriksiyon enzim analizi ile D543N, 3’UTR polimorfizmlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR programı ve Tablo 3.13’de D543N, 3’UTR ve INT4 bölgelerindeki polimorfizmleri ARMS-PZR yöntemiyle belirlemek amacı ile yapılan PZR’lerde kullanılan programlar gösterilmektedir.

Tablo 3.11. 5’ Promotor bölgesindeki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan PZR programı.

Program Türü	Derece (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	2’	-
Denatürasyon	94	1’	28
Bağlanma	58	1’	
Uzatma	72	1’	
Son Uzatma	72	10’	-

Tablo 3.12. D543N ve 3’UTR bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan PZR programı.

Program Türü	Derece (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2’	-
Denatürasyon	95	1’	35
Bağlanma	58	1’	
Uzatma	72	2’	
Son Uzatma	72	7’	-

Tablo 3.13. D543N, 3’UTR ve INT4 bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan ARMS-PZR programı.

Program Türü	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	2’	-
Denatürasyon	94	10’’	10
Bağlanma	65	1’	
Denatürasyon	94	10’’	20
Bağlanma	61	50’’	
Uzatma	72	30’’	

### 3.2.5. Agaroz Jel Elektrofrez

Elektroforez yürütme tamponu olarak hazırlanan 5XTEB ana stok, dH<sub>2</sub>O ile 1/10 oranında sulandırıldı. Hazırlanan %2'lik agaroz jele, 5-6µl PZR ürünü, 1-2µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 120V'da 30 dakika yürütüldükten sonra jel, UV altında incelenerek NRAMP1 geninin 5' Promotor, D543N, 3'UTR ve INT4 polimorfik noktalarını içeren DNA birimlerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı incelendi.

#### 3.2.5.1. NuSieve Agaroz Jel Elektrofrez

Tampon içinde çözünme sıcaklığı 65 C°den az olan NuSieve GTG Agaroz, küçük DNA parçalarının ayrılmasında kullanılan bir agaroz türüdür. Ayırma gücü, rutinde kullanılan agarozla göre daha kuvvetlidir.

NRAMP1 geninin D543N, 3'UTR ve INT4 polimorfizmlerini restriksiyon enzim analizi ile belirlemek amacıyla %2'lik NuSieve agaroz jeller hazırlandı. 0.40 g nusieve, 0.20 g agaroz tartılarak 0.5XTEB tamponu ile 30 ml'ye tamamlandı. Karışım kaynatılıp soğutulduktan sonra 1.5µl etidyum bromür eklendi ve sıvı haldeki jel, jel tabağına döküldü. Yaklaşık 30 dakika sonra donan jele, kesilmiş PZR ürünleri ile birlikte DNA standartı yüklenerek 120 V'da 40-45 dakika yürütüldü ve jel UV altında incelendi.

### 3.2.6. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

ARMS-PZR ile elde edilen verileri doğrulamak amacıyla, NRAMP1 genindeki D543N, 3'UTR ve INT4 polimorfizmleri restriksiyon enzim analizi ile de incelendi. Polimorfik bölgelerin restriksiyon enzim analizinde, çalışılan bölgelerin içinde kesim noktası olduğu bilinen enzimler kullanıldı [72]. 15. eksondaki D543N polimorfizmi incelemek amacı ile, Eco471 (AvaII) restriksiyon enzimi, 3'UTR polimorfizmini incelemek amacı ile de BseGI (FokI) enzimi kullanıldı. INT4 bölgesindeki polimorfizmi belirlemek amacıyla ARMS-PZR ürünleri ApaI enzimi ile kesildi. Kullanılan restriksiyon enzimleri için uygulanan enzim kesim koşulları Tablo 3.14, Tablo 3.15 ve Tablo 3.16'da verilmektedir.

Tablo 3.14. D543N polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	10µl
<p style="text-align: center;">T</p> <p>Eco471 5'...G↓GAC C.....3'</p> <p>(AvaII) 3'...C CTG↑G.....5'</p> <p style="text-align: center;">A</p>	0,5µl
Tampon	2µl
Distile su	7.5µl
Toplam hacim	20µl

Tablo 3.15. 3UTR polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	10µl
<p>BseGI 5'...GGATG NN↓...3'</p> <p>(FokI) 3'...CCTAC↑NN.....5'</p>	0,5µl
Tampon	2µl
Distile su	7.5µl
Toplam hacim	20µl

Tablo 3.16. INT4 polimorfizminin belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi koşulları.

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	10µl
<p>ApaI 5'-GGGCC↓C...3'</p> <p style="text-align: center;">3'-C↑CCGGG...5'</p>	0,5µl
Tampon	2µl
Distile su	7.5µl
Toplam hacim	20µl

### 3.2.7. DNA Dizi Analizi

NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesindeki dinükleotid tekrarlarını içeren PZR ürünleri ABI (Applied Biosystems Intercooperation ) 3100 Avant DNA dizi analizi tekniği ile incelendi. Bunun için ilk olarak, incelenmesi istenen hedef bölge Tablo 3.11'deki PZR programı kullanılarak 50 µl'lik hacimde çoğaltıldı. PZR'de çoğaltımın gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için ürünün 5 µl'si %2'lik agaroz jele yüklenerek istenilen bölgenin çoğaltıldığı belirlendi. Kalan 45 µl'lik ürün MgSO<sub>4</sub>-etil alkol (0.2M MgSO<sub>4</sub>, %70 etil alkol ) yöntemi kullanılarak aşırı primer ve dNTP'lerden arındırıldı. Bu yöntemde 45 µl'lik ürün 1.5'lik tüpe alınarak üzerine 150 µl MgSO<sub>4</sub>-etil alkol solüsyonu eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra tüpler 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilerek üst faz atıldı ve ürünlerin alkolden tamamen kurtulması için 37 °C'lik etüvde 10-15 dakika bekletildi. Tüpler kurduktan sonra ürünler 10 µl distile suda çözündürüldü. ABI firmasına ait hazır kitlerden elde edilen dideoksi nükleotidlerin kullanılmasıyla ürünlerin floresan ile işaretlenmesini sağlayan PZR Tablo 3. 17'de verilen karışım koşullarında ve Tablo 3.11'de belirtilen programa göre gerçekleştirildi. Dizi analizi için yapılan PZR ürünleri tekrar MgSO<sub>4</sub>-etil alkol (0.2M MgSO<sub>4</sub>, %70 etil alkol ) yöntemi kullanılarak saflaştırılarak 20 µl distile suda çözündürüldü. Ürünün 15 µl'si dizi analizi cihazı içerisinde bulunan tabladaki kuyucuklara hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu. ABI 3100 Avant otomatize dizi analizi cihazında bulunan POP-6 DNA dizi analizi jelinde yaklaşık 1.5 saat yürüdüktan sonra, yine sistemin içinde bulunan bilgisayardan dizilere ait pikler okundu ve NRAMP1 gen dizisi ile karşılaştırarak sonuçlar değerlendirildi.

Toplam 423 örnekten 372'sinin DNA dizilemesinde özel sektörün dizileme hizmetinden yararlandı.

Tablo 3.17. 5' Promotor bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan Dizileme PZR karışımı.

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile su	4.4	-
5XDizileme tamponu	1	1X
ddNTP karışımı (25mM)	0.5	1.25mM
Primer pro1 (0.8pmol/ $\mu\text{l}$ )	2	1.6pmol
Taq polimeraz (5U/ $\mu\text{l}$ )	0.1	0.5U
PCR Ürünü (150ng/ $\mu\text{l}$ )	2	30ng
Toplam hacim	10	

### 3.2.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel testler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 11.5 programı kullanılarak yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarındaki polimorfizm değerlerinin karşılaştırılmasında ve farklı klinik özelliklerin kendi aralarında karşılaştırılmasında  $\chi$ -kare testi kullanıldı ve p değeri 0.05'in altında bulunan değerler anlamlı kabul edildi. p değeri 0.05'in altında bulunan değerlerde %95 güven aralığı (CI) ve risk oranları (OR) hesaplandı.

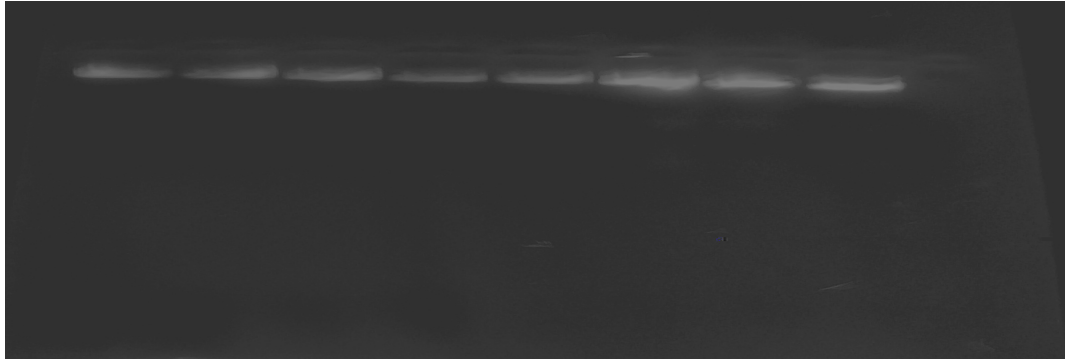
## 4. BULGULAR

### 4.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA izolasyonu, 98 romatoid artrit, 112 tüberküloz hastasına ve 213 sağlıklı kontrol grubuna (133'ü romatoid artrit, 80'i tüberküloz kontrolü) ait kan materyallerinden, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 2.2.1'de belirtilen yonteme göre yapıldı.

#### 4.1.1. DNA'nın Kalitatif Tayini

İzole edilen tüm genomik DNA'lar %1 (w/v)'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Genomik DNA'lara ait bantlar ultraviyole (UV) ışık altında parlak net ve keskin tekli bantlar halinde gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Genomik DNA'ların % 1'lik agaroz jeldeki görünimleri

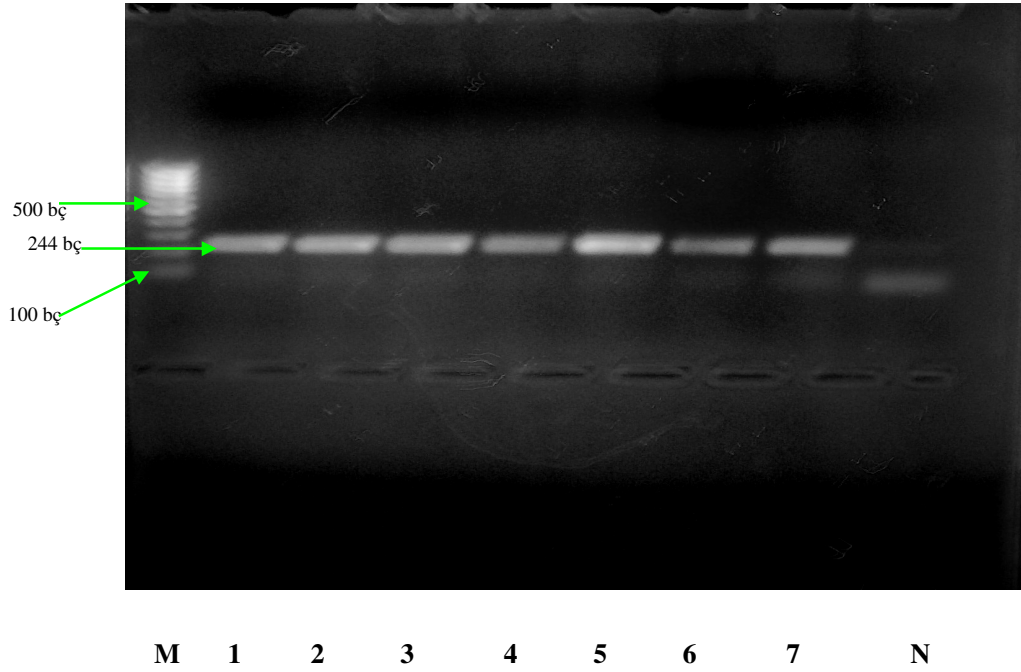
#### 4.1.2. DNA'nın Kantitatif Tayini

İzole edilen genomik DNA'nın kantitatif tayini, spektrofotometrik ölçümler ile yapıldı. Spektrofotometre analizleri sonucunda,  $OD_{260}$  değerine göre saptanan DNA konsantrasyonları birbirinden farklılık göstermekle birlikte, bütün örnekler steril distile su ile sulandırılarak, konsantrasyonları 150ng/ $\mu$ l olacak şekilde ayarlandı. DNA'ların

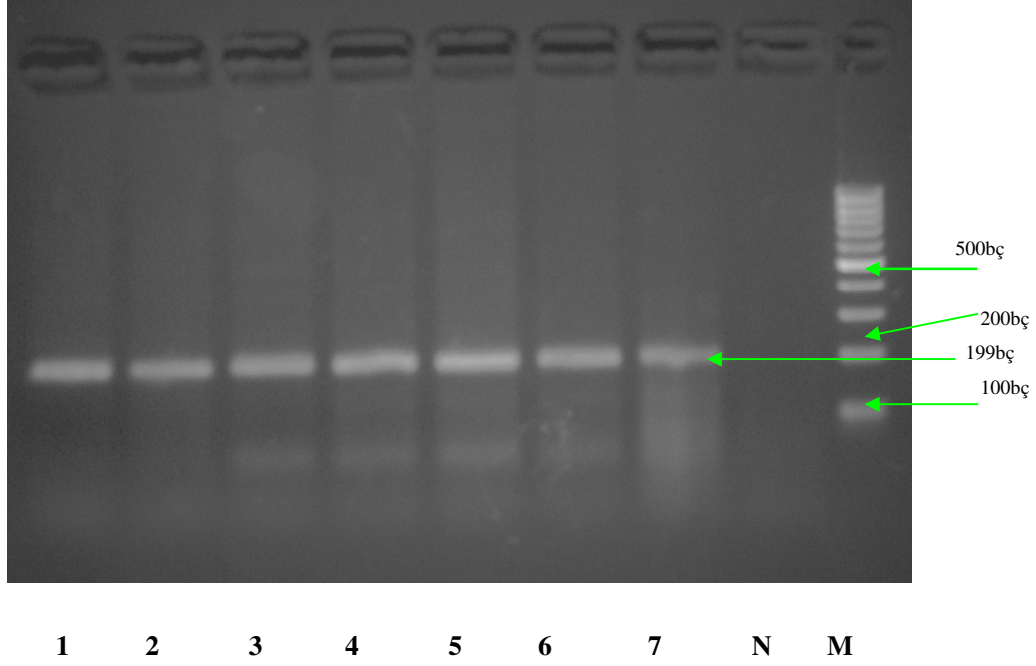
saflığı  $OD_{260}$  ve  $OD_{280}$  değerlerinin birbirlerine olan oranı alınarak hesaplandığında, örneklerin saflığının 1.52- 1.79 değerlerinde olduğu saptandı.

#### 4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ

NRAMP1 geninin restriksiyon enzim analizi yapılacak olan D543N ve 3'UTR polimorfik noktalarını içeren 244 bç'lik bölgesi ve dizi analizi yapılacak olan 199 bç'lik 5' Promotor bölgesi, Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.4'de belirtilen PZR yöntemi ile çoğaltılarak % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2. NRAMP1 geninin D543N ve 3UTR polimorfik noktalarını içeren 240 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü. (M:DNA Standartı, 100bç'lik N: Negatif Kontrol)

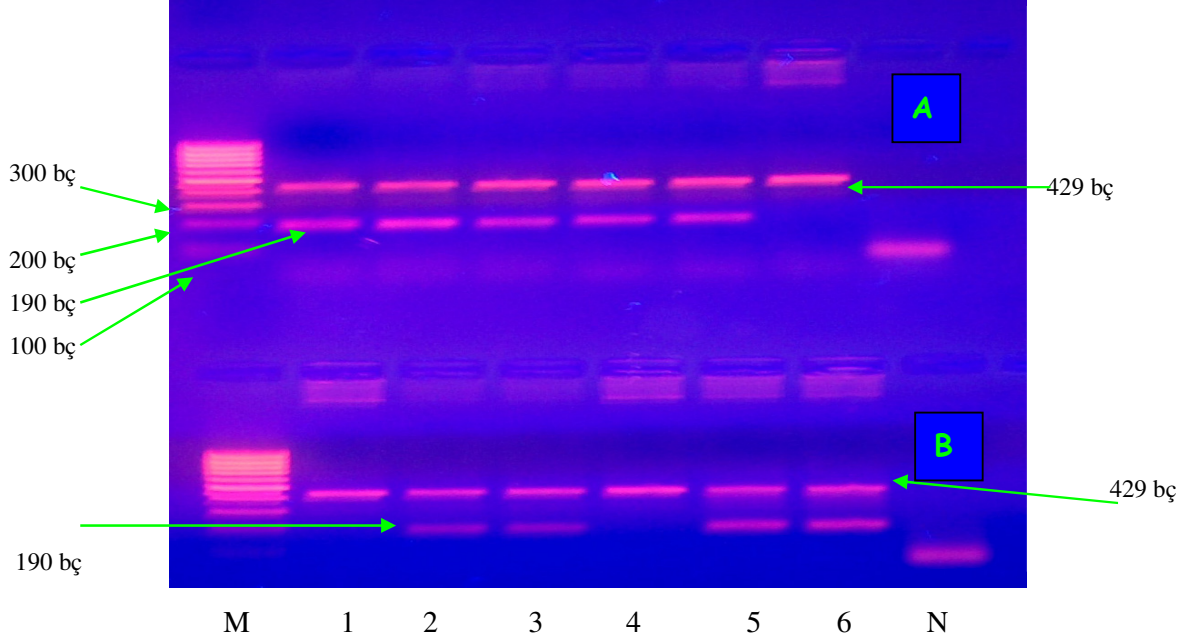


Şekil 4.3. NRAMP1 geninin 5' Promotor bölgesini içeren yaklaşık 199 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünümü. (M:DNA Standartı,100bç'lik N: Negatif Kontrol)

#### 4.2.1. Allele Özgü Nükleotidlerle Mutasyon Belirleme Tekniği (ARMS) Analizleri

NRAMP1 geninin D543N, 3'UTR ve INT4 bölgelerindeki polimorfizmleri, Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.4.1'de belirtilen ARMS-PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

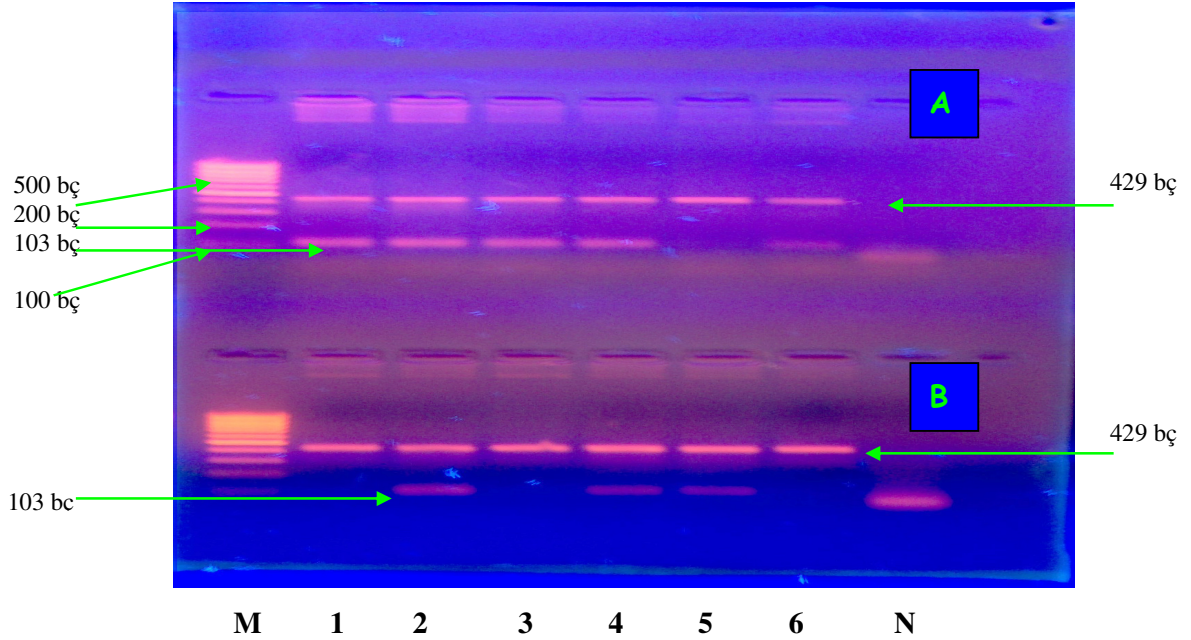
Elde edilen veriler Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmektedir.



Şekil 4.4. NRAMP1 geninin D543N polimorfizminin incelendiği 190 bç'lik ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri. (A: Allel G'ye özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, B: Allel A'ya özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, M:DNA Standartı (100bç'lik), N: Negatif Kontrol, 429bç: kontrol gen bölgesi (İnsan Büyüme Hormonu geni), 1 ve 4 no'lu örnekler G/G homozigot, 2,3 ve 5 no'lu örnekler heterozigot G/A, 6 no'lu örnek homozigot A/A)

Tablo 4.1. Romatoid Artrit, Tüberküloz ve Kontrol Grubunda D543N Polimorfizm Değerleri

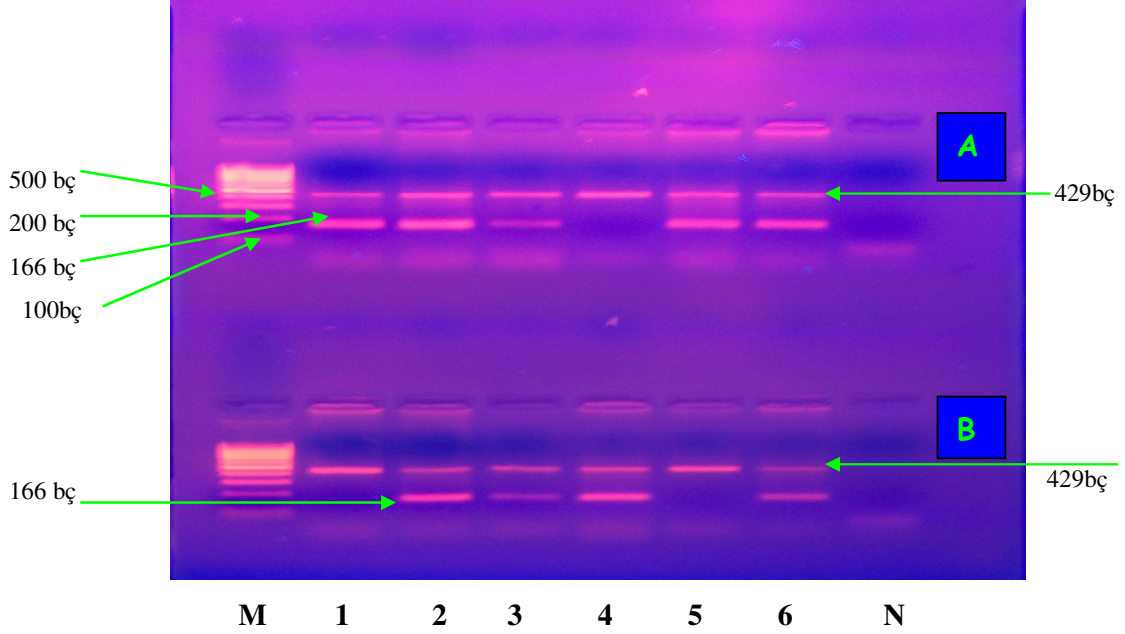
D543N (G/A)	A/A	G/A	G/G	Toplam
Romatoid Artrit	1	6	91	98
Tüberküloz	0	4	108	112
Romatoid Artrit Kontrol	0	5	128	133
Tüberküloz Kontrol	0	1	79	80



Şekil 4.5. NRAMP1 geninin 3'UTR polimorfizminin incelendiği ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri. (A: delesyonsuz allele özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, B: delesyonlu allele (-TGTG) özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, M:DNA Standartı (100bç'lik), N: Negatif Kontrol, 429bç: kontrol gen bölgesi (İnsan Büyüme Hormonu geni), 1,3 ve 6 no'lu örnekler homozigot delesyonsuz/delesyonsuz, 2 ve 4 no'lu örnekler heterozigot delesyonsuz/delesyon, 5 no'lu örnek homozigot delesyon/delesyon)

Tablo 4.2. Romatoid Artrit, Tüberküloz ve Kontrol Grubunda 3'UTR Polimorfizm Değerleri

3'UTR (-TGTG delesyonu)	Delesyon/Delesyon	Delesyon/Normal	Normal/Normal	Toplam
Romatoid Artrit	1	6	91	98
Tüberküloz	0	4	108	112
Romatoid Artrit Kontrol	0	5	128	133
Tüberküloz Kontrol	0	1	79	80



Şekil 4.6. NRAMP1 geninin INT4 polimorfizminin incelendiği ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri. (A: Allel G'ye özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, B: Allel C'ye özgü primerle yapılan PZR reaksiyonları, M:DNA Standartı (100bç'lik), N: Negatif Kontrol, 429bç: kontrol gen bölgesi (İnsan Büyüme Hormonu geni), 1 ve 5 no'lu örnekler homozigot G/G, 2,3 ve 6 no'lu örnekler heterozigot G/C, 4 no'lu örnek homozigot C/C )

Tablo 4.3. Romatoid Artrit, Tüberküloz ve Kontrol Grubunda INT4 Polimorfizm Değerleri

INT4G/C	C/C	G/C	G/G	Toplam
Romatoid Artrit	6	31	61	98
Tüberküloz	3	29	80	112
Romatoid Artrit Kontrol	1	30	102	133
Tüberküloz Kontrol	1	17	62	80

### 4.3. RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ (REA)

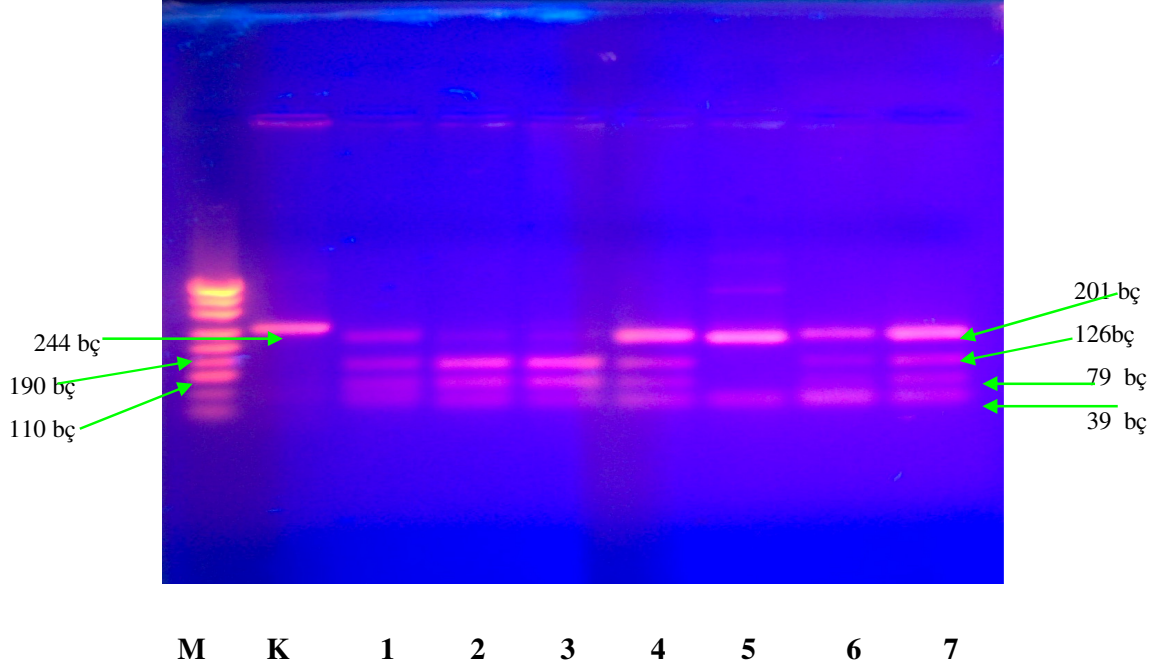
NRAMP1 geninin 15.ekson ve 3'UTR bölgesindeki incelenen polimorfik noktaları içeren 244 bç'lik bölgesi Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde belirtilen PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, yine Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde belirtilen Restriksiyon Enzim Analizi yöntemi uygulanarak % 2'lik nusieve agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

NRAMP1 geninin D543N polimorfizminin incelendiği, Eco471(AvaII) restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu PZR ürünü, enzim tanıma noktasındaki değişime bağlı olarak beklendiği gibi, homozigot G/G bireylerde 126, 79 ve 39 bç'lik DNA parçaları şeklinde, homozigot A/A bireylerde 201 ve 39 bç'lik DNA parçaları şeklinde, heterozigot G/A bireylerde ise 201, 126, 79 ve 39 bç'lik DNA parçaları şeklinde gözlendi (Şekil 4.7).

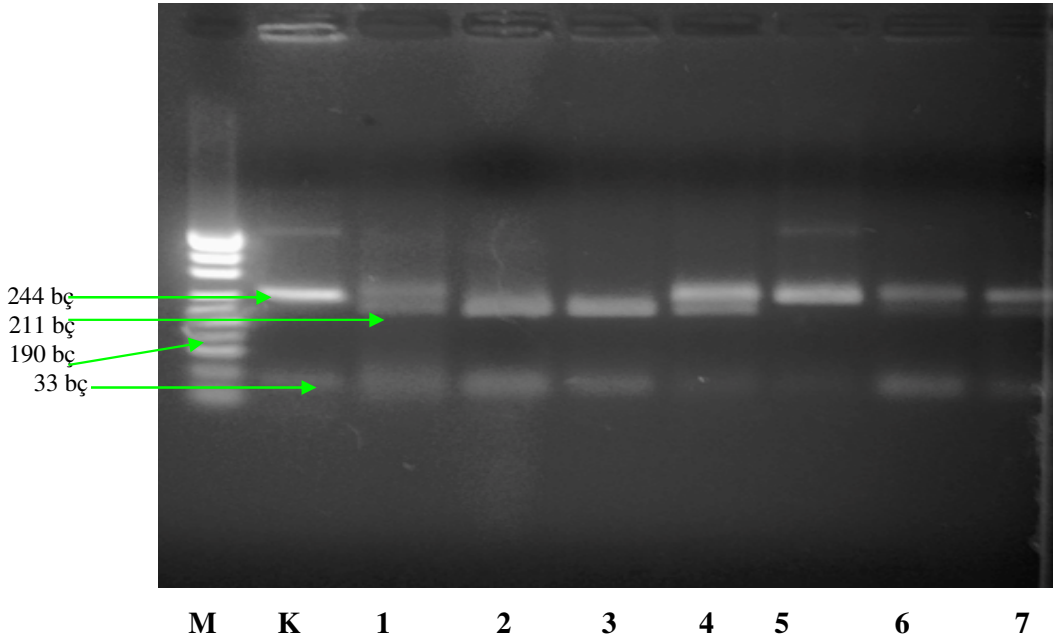
NRAMP1 geninin 3'UTR polimorfizminin incelendiği, BseGI (FokI) restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu PZR ürünü, enzim tanıma noktasındaki değişime bağlı olarak beklendiği gibi, homozigot delesyonsuz/delesyonsuz bireylerde 211 ve 33bç'lik DNA parçaları şeklinde, homozigot delesyonlu/delesyonlu bireylerde 244 bç'lik tek DNA parçası şeklinde, heterozigot delesyonsuz/delesyonlu bireylerde ise 244, 211 ve 33 bç'lik DNA parçaları şeklinde saptandı (Şekil 4.8).

INT4 polimorfizminin çalışıldığı ARMS-PZR'da allel G'ye özgü tasarlanan primerler ve allel C'ye özgü tasarlanan primerler kullanılarak elde edilen 166 bç'lik PZR ürünleri ApaI restriksiyon enzimi ile kesildi. Allel G'ye özgü tasarlanan primerlerle elde edilen PZR ürünleri kesime uğramaz iken, Allel C'ye özgü tasarlanan primerlerle elde edilen PZR ürünleri ApaI enzimi tarafından kesime uğrayarak 148 bç ve 18 bç'lik DNA parçaları şeklinde jelde gözlendi (Şekil 4.9).

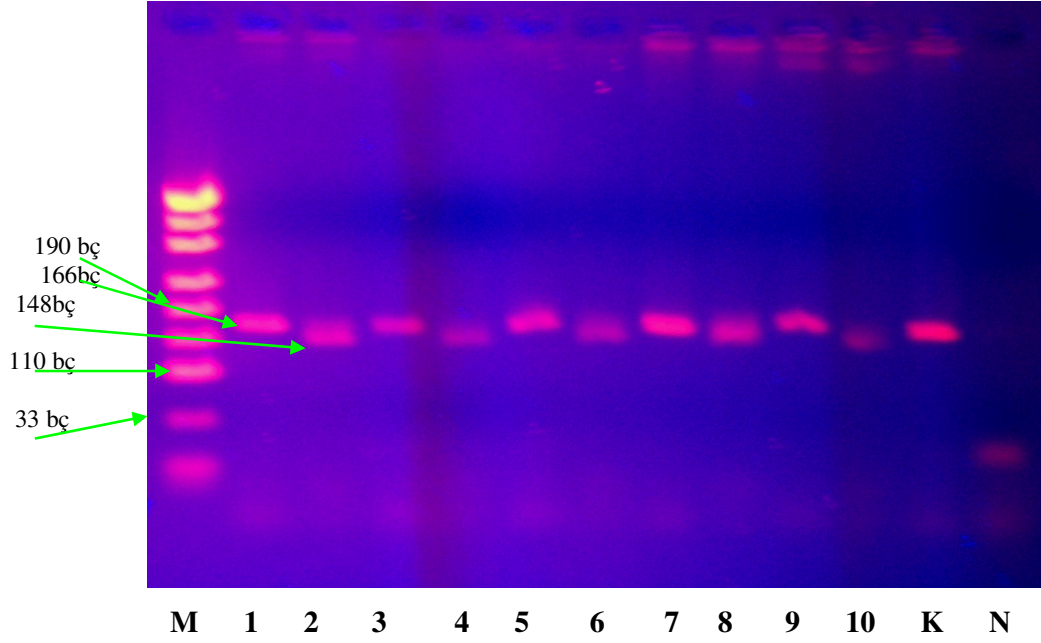
Böylece ARMS-PZR yönteminde elde edilen sonuçların doğruluğu REA ile elde edilen sonuçlarla da kanıtlandı.



Şekil 4.7. NRAMP1 geninin D543N polimorfizminin incelendiği Eco471(AvaII) restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri (M: DNA Standartı (pUC19DNA/MspI), K:Kesilmemiş Ürün, 2 ve 3 no'lu örnekler homozigot G/G, 1,4,6 ve 7 no'lu örnekler heterozigot G/A, 5 no'lu örnek homozigot A/A)



Şekil 4.8. NRAMP1 geninin 3'UTR polimorfizminin incelendiği, BseGI (FokI) restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri. (M: DNA Standartı (pUC19DNA/MspI), K:Kesilmemiş Ürün, 2 ve 3 no'lu örnekler homozigot delesyonsuz/delesyonsuz, 1,4,6 ve 7 no'lu örnekler heterozigot delesyonlu/delesyonsuz, 5 no'lu örnek homozigot delesyonlu/delesyonlu)



Şekil 4.9. NRAMP1 geninin INT4 polimorfizminin incelendiği, ApaI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş ARMS-PZR ürünlerinin %2'lik nusieve agaroz jeldeki görünüşleri. (M: DNA Standartı (pUC19DNA/MspI), 1,3,5,7 ve 9 no'lu örnekler ARMS-PZR G alleli ürünleri, 2,4,6,8 ve 10 no'lu örnekler ARMS-PZR C alleli ürünleri, K:Kesilmemiş Ürün, N:Negatif kontrol)

#### 4.4. DNA DİZİ ANALİZİ VERİLERİ

NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesinin allel analizleri, Tablo 4.4.'de verilen, NRAMP1 çalışmalarında kullanılmakta olan, allel isimlendirme sistemine [75,87] göre gerçekleştirildi. Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14'de tespit edilen allellere ait örnek DNA dizilemeleri verilmektedir.

DNA dizi analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.5'de verilmektedir.

Tablo 4.4. NRAMP1 Geninin 5' Promotor Bölgesindeki Allellerin DNA Dizisi

Allel	DNA Dizisi	Referans
Allel 1	T(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>11</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub>	59
Allel 2	T(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>10</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub>	59
Allel 3	T(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>9</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub>	59
Allel 4	T(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>10</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub> T(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>4</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub>	59
Allel 5	T(gT) <sub>4</sub> AC(gT) <sub>5</sub> AC(gT) <sub>10</sub> ggCAGA(g) <sub>6</sub>	68

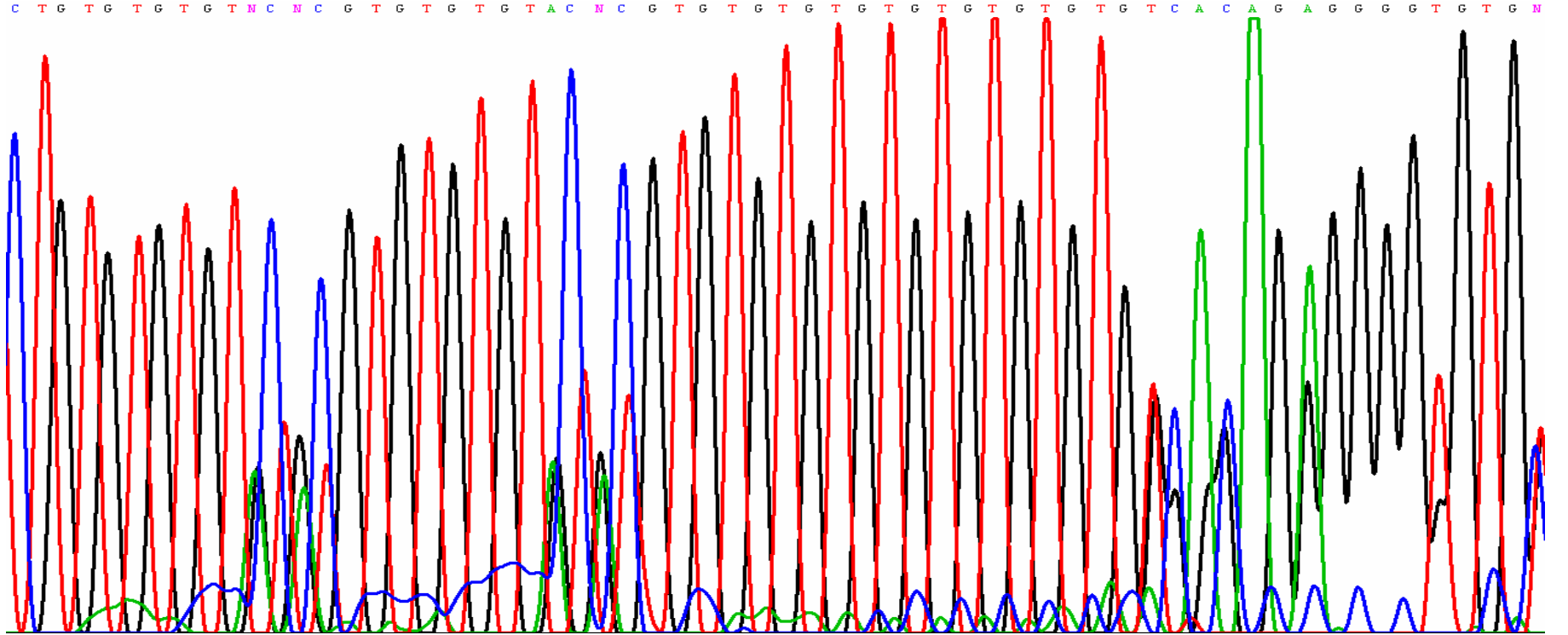
Tablo 4.5. NRAMP1 Geninin 5' Promotor Bölgesinin DNA Dizi Analizi Bulguları

5'Promotor Bölgesi Allelleri	Romatoid Artrit	Tüberküloz	Romatoid Artrit Kontrol	Tüberküloz Kontrol
Allel 2/2	6	4	5	2
Allel 2/3	30	30	39	24
Allel 3/3	60	78	89	54
Diğer Alleller (2/5, 3/5)	2			
Toplam	98	112	133	80









Şekil 4.13. Allel 2/5'in DNA Dizisi



#### 4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI

Romatoid artrit ve kontrol grubundan elde edilen DNA dizi analizi verilerinin istatistiksel analizi sonucu NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesinde 2/2, 2/3 ve 3/3 genotiplerinin sıklıkları sırasıyla kontrol grubunda %3.76, %29.32, %66.92, romatoid artrit grubunda %6.12, %30.62, %61.22 olarak bulundu. Daha nadir olarak görülen allel 1 ve 4'e rastlanmadı. Ayrıca romatoid artrit grubunda 2 tane de allel 5 gözlemlendi. RA ve kontrol grubu arasında genotip oranları bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0.590$ ). Kontrol grubunda allel 2'nin frekansı %18.42, allel 3'ün % 81.58, RA grubunda allel 2'nin %21.93, allel 3'ün % 77.04 ve allel 5'in %1.03 olduğu belirlendi. Allel 3'ün kontrol grubunda, RA grubuna göre daha yüksek oranda olduğu, allel 2'nin ise kontrol grubunda, RA grubuna göre daha az oranda olduğu gözlemlendi ancak bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0.162$ ) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Romatoid Artritte 5' promotor Bölgesi Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

5'Promotor Bölgesi Genotipleri	Romatoid Artrit	Kontrol	p	%95 CI
Allel 2/2	6 (%6.12)	5 (%3.76)	0.590	
Allel 2/3	30 (%30.62)	39 (%29.32)		
Allel 3/3	60 (%61.22)	89 (%66.92)		
Diğer Alleller (2/5,3/5)	2 (%2.04)			
Toplam	98	133		
Allel frekansı			0.162	
Allel 2	43 (%21.93)	49 (%18.42)		
Allel 3	151 (%77.04)	217 (% 81.58)		
Allel 5	2 (1.03)			

intron 4 bölgesinin analizinde, romatoid artrit grubunda C/C, G/C ve G/G genotipleri sırasıyla %6.12, %31.63 ve %62.24 oranlarında, kontrol grubunda ise sırasıyla %0.75, %22.55 ve %76.70 oranlarında belirlendi. Allel C'nin frekansı RA grubunda %21.93, Allel G'nin frekansı %78.07 oranında gözlenirken, kontrol grubunda Allel C'nin frekansı %12.03 ve Allel G'nin frekansı %87.97 oranında gözlemlendi. İki grup karşılaştırıldığında C/C ve G/C allellerinin RA grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p=0.012$ ), allel frekansları açısından da C allelinin RA grubunda anlamlı olarak ( $p=0.005$ , %95CI 1.20-2.77, O.R=1.824, ) yüksek olduğu belirlendi. C Allelini taşıyan bireylerin RA hastası olma olasılıklarının, bu alleli taşımayan bireylere göre 1.8 kat arttığı belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Romatoid Artritte INT4 Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

INT 4 Genotipleri	Romatoid Artrit	Kontrol	p	%95 CI
C/C	6 (%6.12)	1 (%0.75)	0.012	O.R: 1.824 1.20-2.77
G/C	31 (%31.63)	30 (%22.55)		
G/G	61 (%62.24)	102 (%76.70)		
Toplam	98	133	0.005	
Allel frekansı				
C	43 (%21.93)	32 (%12.03)		
G	153 (%78.07)	234 (%87.97)		

15. eksondaki polimorfizmin analizinde, romatoid artrit grubunda A/A, G/A ve G/G genotiplerinin sıklıkları sırasıyla % 1.02, % 6.12 ve % 92.86, kontrol grubunda ise sırasıyla % 0, % 3.76 ve % 96.24 oranlarında tespit edildi. G/A genotipi ve G/G genotipi sıklığı RA grubunda kontrol grubuna göre yüksek oranda bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark ( $p= 0.352$ ) bulunamadı. Kontrol grubunda A/A genotipine rastlanmadı. Allel frekansları karşılaştırıldığında, A allel frekansının RA grubunda % 4.08, kontrol grubunda % 1.8 oranında, G allelinin RA grubunda % 95.92, kontrol grubunda % 98.12 oranında olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunmadığı belirlendi ( $p=0.130$ ). 3'UTR bölgesindeki 4 nükleotidlik delesyon polimorfizmi ile 15. eksondaki D543N polimorfizmi arasında bağlantı dengesizliği belirlendi. D543N polimorfizmi bakımından A/A genotipine sahip bireylerde 3'UTR

polimorfizmi bakımından daima delesyon/delesyon genotipine, G/A genotipi bulunan bireylerde daima delesyonsuz/delesyon genotipine ve G/G genotipine sahip bireylerde daima delesyonsuz/delesyonsuz genotipine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Romatoid Artritte D543N/3'UTR Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

D543N/3'UTR Genotipleri	Romatoid Artrit	Kontrol	p	%95 CI
A/A (Delesyon/Delesyon)	1 (%1.02)	0 (%0)	0.352	
G/A (Delesyonsuz/Delesyon)	6 (%6.12)	5 (%3.76)		
G/G (Delesyonsuz/Delesyonsuz)	91 (%92.86)	128 (%96.24)		
Toplam	98	133		
Allel frekansı				
A/Delesyon	8 (%4.08)	5 (%1.88)	0.130	
G/Delesyonsuz	188 (%95.92)	261 (%98.12)		

Tüberküloz ve kontrol grubunda 5' promotor bölgesindeki polimorfizmin analizinde, tüberküloz grubunda 2/2, 2/3 ve 3/3 genotiplerinin sıklıkları sırasıyla % 3.57, % 26.79 ve % 69.64 oranlarında bulunurken, kontrol grubunda da sırasıyla % 2.50, % 30.00, % 67.50 oranlarında bulundu. 2/2 ve 3/3 genotiplerinin sıklığı tüberküloz grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek, 2/3 genotipinin sıklığı ise kontrol grubuna göre tüberküloz grubunda daha az oranda bulundu ancak bu farkın istatistiksel olarak bir anlamlılık oluşturmadığı görüldü (p=0.829). Allel 2 nin sıklığı tüberküloz grubunda % 16.96, Allel 3'ün ise % 83.04 oranında olup, kontrol grubu oranında gözlenen oranlarla yaklaşık olarak aynı değerdedir. Kontrol grubunda Allel 2 sıklığı % 17.50, Allel 3 sıklığı % 82.50 oranında olduğu ve anlamlı bir bağlantı bulunmadığı görüldü (p=0.444) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Tüberkülozda 5' promotor Bölgesi Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

5'Promotor Bölgesi Genotipleri	Tüberküloz	Kontrol	p	%95 CI
Allel 2/2	4 (%3.57)	2 (%2.50)	0.829	
Allel 2/3	30 (%26.79)	24 (%30.00)		
Allel 3/3	78 (%69.64)	54 (67.50)		
Diğer Alleller				
Toplam	112	80		
Allel frekansı				
Allel 2	38 (%16.96)	28 (%17.50)	0.444	
Allel 3	186 (%83.04)	132 (%82.50)		
Diğer Alleller				

INT4 bölgesinin analizinde, C/C, G/C ve G/G genotiplerinin sıklıkları tüberküloz grubunda sırasıyla % 2.68, % 25.89 ve % 71.43 değerlerinde, kontrol grubunda ise sırasıyla % 1.25, % 21.25 ve % 77.50 değerlerinde bulundu. Tüberküloz grubunda C/C ve G/C genotiplerinin sıklıkları kontrol grubuna göre yüksek, G/G genotipinin sıklığı ise kontrol grubuna göre daha düşük değerlerde olmakla birlikte bu farkın istatistiki olarak bir anlamlılık değerinde olmadığı ( $p=0.574$ ) belirlendi. Tüberküloz grubunda C alleli sıklığı % 15.62 kontrol grubunda % 11.8, G alleli sıklığı tüberküloz grubunda % 84.38, kontrol grubunda % 88.12 değerlerinde bulundu ve tüberküloz ile bu polimorfizm arasında anlamlı bir bağlantı olmadığı belirlendi ( $p=0.337$ ) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Tüberkülozda INT4 Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

INT 4 Genotipleri	Tüberküloz	Kontrol	p	%95 CI
C/C	3 (%2.68)	1 (%1.25)	0.574	
G/C	29 (%25.89)	17 (%21.25)		
G/G	80 (%71.43)	62 (%77.50)		
Toplam	112	80		
Allel frekansı				
C	35 (%15.62)	19 (%11.88)	0.337	
G	189 (%84.38)	141 (%88.12)		

RA ve kontrol grubu arasındaki sonuçlara benzer şekilde, tüberküloz ve kontrol grubunda da D543N ve 3'UTR polimorfizmi arasında bağlantı dengesizliği olduğu görüldü. Bu grupta da D543N polimorfizmi bakımından A/A genotipini taşıyan bireylerin 3'UTR polimorfizmi bakımından delesyon/delesyon genotipini, G/A genotipini taşıyan bireylerin delesyonsuz/delesyon genotipini ve G/G genotipini taşıyan bireylerin de delesyonsuz/delesyonsuz genotipini taşıdığı belirlendi. Tüberküloz grubunda A/A, G/A ve G/G genotiplerinin sıklığı sırasıyla % 0, % 3.91 ve % 96.09 oranlarında, kontrol grubunda ise sırasıyla % 0, % 1.25 ve % 98.75 oranlarında bulundu ve anlamlı bir bağlantı görülmedi ( $p=0.283$ ). Hem tüberküloz hem de kontrol grubunda A/A genotipine rastlanmadı. Allel A'nın frekansı tüberkülozda % 1.95, kontrolde % 0.62, Allel G'nin frekansı tüberkülozda % 98.05, kontrolde % 99.38 oranında birbirine yakın değerlere olup bu polimorfizmle tüberküloz arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı ( $p=0.286$ ) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Tüberkülozda D543N/3'UTR Polimorfizminin İstatistiksel Analizi

D543N/3'UTR Genotipleri	Tüberküloz	Kontrol	p	%95 CI
A/A (Delesyon/Delesyon)	0 (%0)	0 (%0)	0.283	
G/A (Delesyonsuz/Delesyon)	4 (%3.91)	1 (%1.25)		
G/G (Delesyonsuz/Delesyonsuz)	108 (%96.09)	79 (% 98.75)		
Toplam	112	80		
Allel frekansı				
A/Delesyon	4 (%1.95)	1 (%0.62)	0.286	
G/Delesyonsuz	220 (%98.05)	159 (%99.38)		

Otoimmün ve infeksiyöz hastalıklarda NRAMP1 allellerinin rolünün daha net olarak belirlenmesi için RA ve tüberküloz grupları kendi arasında istatistiksel olarak analiz edildiğinde, RA ve tüberküloz grupları arasında anlamlı bağlantı bulunmadı (5' promotor polimorfizminin analizinde  $p= 0.446$ , INT4 polimorfizminin analizinde  $p= 0.259$ , D543N/3'UTR polimorfizmlerinin analizinde  $p= 0.424$ ) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Tüberküloz ve Romatoid Artritte NRAMP1 Polimorfizmlerinin İstatistiksel Analizi

NRAMP1 Polimorfizmleri	Tüberküloz	Romatoid Artrit	p	%95 CI
<b>5' Promotor Genotipleri</b>				
Allel 2/2	4 (%3.57)	6 (%6.12)	0.446	
Allel 2/3	30 (%26.79)	30 (%30.62)		
Allel 3/3	78 (%69.64)	60 (%61.22)		
Diğer Alleller		2 (%2.04)		
Toplam	112	98		
<b>Allel frekansı</b>				
Allel 2	38 (%16.96)	43 (%21.93)	0.195	
Allel 3	186 (%83.04)	151 (%77.04)		
Allel 5		2 (%1.03)		
<b>INT 4 Genotipleri</b>				
C/C	3 (%2.68)	6 (%6.12)	0.259	
G/C	29 (%25.89)	31 (%31.63)		
G/G	80 (%71.43)	61 (%62.24)		
Toplam	112	98		
<b>Allel frekansı</b>				
C	35 (%15.62)	43 (%21.93)	0.091	
G	189 (%84.38)	153 (%78.07)		
<b>D543N/3'UTR Genotipleri</b>				
A/A (Delesyon/Delesyon)	0 (%0)	1 (%1.02)	0.424	
G/A (Delesyonsuz/Delesyon)	4 (%3.91)	6 (%6.12)		
G/G (Delesyonsuz/Delesyonsuz)	108 (%96.09)	91 (%92.86)		
Toplam	112	98		
<b>Allel frekansı</b>				
A/Delesyon	4 (%1.95)	8 (%4.08)	0.195	
G/Delesyonsuz	220 (%98.05)	188 (%95.92)		

Ayrıca NRAMP1 polimorfizmlerinin RA hastalığının şiddeti ile bağlantısını araştırmak için, RA'nın hastalık şiddetinin göstergesi olan RF pozitifliği ve hastalarda erozyon bulunup bulunmamasına göre de alt gruplar oluşturuldu ve bunlar arasında istatistiksel farklılık bulunup bulunmadığı incelendi (Tablo 4.13). Bu analize göre RF ölçümü yapılan 92 RA hastasının 58'inde RF pozitif ve 34'ünde negatif olarak saptandı. RF pozitif bulunan bireylerde 5' promotor bölgesi 2/2, 2/3 ve 3/3 genotiplerinin sıklıkları sırasıyla % 3.45, % 29.31 ve % 67.24, RF negatif olan bireylerde sırasıyla % 8.82, % 32.35 ve % 58.83 oranlarında saptandı ve istatistiksel anlamlılık bulunamadı (p=0.499).

5' promotor bölgesi polimorfizm sıklıklarına benzer şekilde, RF pozitif olan bireylerde INT4 bölgesi C/C, C/G ve G/G genotiplerinin sıklıkları sırasıyla % 1.72, % 29.31 ve % 68.97 oranlarında, RF negatif olan bireylerde ise sırasıyla % 8.82, % 32.35 ve % 58.83 oranlarında saptandı ve istatistiksel anlamlılık bulunamadı (p=0.259). D543N ve bu bölgeyle bağlantı dengesizliği gösteren 3'UTR bölgesi genotipleri analiz edildiğinde ise, RF pozitif olan bireylerde A/A, G/A ve G/G'nin sıklıkları sırasıyla % 0, % 6.90 ve % 93.10, RF negatif olan bireylerde % 2.94, % 5.88 ve % 91.18 oranlarında bulundu. Bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlılık oluşturmadığı görüldü (p=0.417).

51'inde erozyon bulunan, 23'ünde erozyon bulunmayan 74 RA hastasının kendi arasında yapılan istatistiksel analizinde, 5' promotor genotiplerinden 2/2, 2/3 ve 3/3'ün erozyon bulunan hastalardaki oranı sırasıyla % 1.96, % 25.49 ve % 72.55, erozyon bulunmayan hastalarda ise % 8.70, % 26.09 ve % 65.22 oranlarında gözlemlendi ve anlamlılık bulunmadı (p=0.418).

INT 4'ün C/C, G/C ve G/G genotiplerinin sıklıkları erozyonlu grupta sırasıyla % 1.96, % 29.41 ve % 68.63, erozyon bulunmayan grupta % 8.70, % 30.43 ve % 60.87 oranlarında gözlemlendi ve anlamlı bağlantı görülmedi (p= 0.391).

D543N'in A/A, G/A ve G/G genotiplerinin erozyonlu gruptaki değerleri % 0, % 5.88 ve % 94.12, erozyon bulunmayan grupta % 0, % 8.70 ve % 91.90 oranlarında görüldü ve anlamlı fark bulunmadı (p=0.497).

Tablo 4.13. Romatoid Artritin Klinik Özelliklerinde NRAMP1 Polimorfizmlerinin İstatistik Analizi

NRAMP1 polimorfizmleri	RF		erozyon	
	+	-	+	-
INT 4 Genotipleri				
C/C	1 (%1.72)	3(%8.82)	1(%1.96)	2(%8.70)
G/C	17(%29.31)	11(%32.35)	15(%29.41)	7(%30.43)
G/G	40(%68.97)	20(%58.83)	35(%68.63)	14(%60.87)
Toplam	58	34	51	23
P=	0.259		0.391	
D543N/3'UTR Genotipleri				
A/A (Delesyon/Delesyon)	0	1(%2.94)	0	0
G/A (Delesyonsuz/Delesyon)	4(%6.90)	2(%5.88)	3(%5.88)	2(%8.70)
G/G (Delesyonsuz/Delesyonsuz)	54(%93.10)	31(%91.18)	48(%94.12)	21(%91.30)
Toplam	58	34	51	23
P=	0.417		0.497	
5'Promotor Genotipleri				
Allelleri				
Allel 2/2	2(%3.45)	3(%8.82)	1(%1.96)	2(%8.70)
Allel 2/3	17(%29.31)	11(%32.35)	13(%25.49)	6(%26.09)
Allel 3/3	39(%67.24)	20(%58.83)	37(%72.55)	15(%65.22)
Toplam	58	34	51	23
P=	0.499		0.418	

Tüberküloz grubunda akciğer tüberkülozlular ile akciğer dışı tüberkülozlu hastalarda NRAMP1 polimorfizm analizi karşılaştırmasında (Tablo 4.14), akciğer tüberkülozlu grupta 5' promotor 2/2, 2/3 ve 3/3 genotiplerinin oranları sırasıyla % 3.49, % 24.42 ve % 72.09, akciğer dışı tüberkülozlu grupta ise % 3.85, % 30.77 ve % 65.38 oranlarında olduğu ve anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü (p=0.804).

INT4 C/C, G/C ve G/G genotiplerinin akciğer tüberkülozlu grupta sırasıyla % 3.49, % 27.91 ve % 68.60, akciğer dışı tüberkülozlu grupta ise % 3.85, % 26.92 ve % 69.23 oranlarında gözlemlendi ve anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.957).

D543N A/A, G/A ve G/G genotiplerinin sıklıkları akciğer tüberkülozlu grupta % 0, % 4.65 ve % 95.35, akciğer dışı tüberkülozlu grupta % 0, % 3.84 ve % 96.16 oranlarına gözlemlendi ve anlamlı fark bulunmadı (p=0.740).

Tablo 4.14. Tüberkülozun Klinik Özelliklerinde NRAMP1 Polimorfizmlerinin İstatistik Analizi

NRAMP1 polimorfizmleri	Tüberküloz	
	Akciğer Tbc	Akciğer dışı Tbc
INT 4 Genotipleri		
C/C	3 (%3.49)	1 (%3.85)
G/C	24 (%27.91)	7 (%26.92)
G/G	59 (%68.60)	18 (69.23)
Toplam	86	26
P= 0.957		
D543N/3'UTR Genotipleri		
A/A (D/D)	0	0
G/A (ND/D)	4 (%4.65)	1 (%3.84)
G/G (ND/ND)	82 (%95.35)	25 (%96.16)
Toplam	86	26
P=0.740		
5'Promotor Bölgesi Genotipleri		
Allelleri		
Allel 2/2	3 (%3.49)	1 (%3.85)
Allel 2/3	21 (%24.42)	8 (%30.77)
Allel 3/3	62 (%72.09)	17 (%65.38)
Toplam	86	26
P=0.804		

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Saf fare ırkları ile yapılan tüberküloz çalışmalarında bazı farelerin tüberküloza direnç gösterdikleri gözlenmiş ve bunun üzerine yapılan genetik çalışmalarda fareye özgü Nramp1 geninin varlığı saptanmıştır. Tüberküloza direnç gösteren farelerde Nramp1 proteinin 169. kodonunda mutasyon olduğu ve glisinin asparagine dönüştüğünün belirlenmesi üzerine Nramp1'in infeksiyonlara karşı korunmada rol oynadığı belirlenmiştir [57].

Faredeki Nramp1 geninin homologunun insanda 2. kromozomda olan NRAMP1 geni olduğu belirlenmiş ancak faredeki mutasyona benzer şekilde bir mutasyon saptanamamıştır ancak gende 11 farklı değişim belirlenmiş ve 4'ü üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır [58].

Bu 4 farklı polimorfizmden biri genin 5' promotor bölgesinde bulunan dinükleotid tekrar polimorfizmidir. 5' promotor bölgesinde 4 farklı allel belirlenmiştir. Bu allellerden allel 1 ve allel 4'nin görülme sıklığı % 0.001, allel 2'nin görülme sıklığı % 25, allel 3'ün ise % 80'dir. Bu allellerden allel 1, 2 ve 4 zayıf promotor, allel 3 ise kuvvetli promotor özelliğindedir. Allel 3 diğer allellere oranla genin 10 kat daha fazla anlatımına sebep olmaktadır. Alleller arasındaki bu farklılıktan dolayı allel 3'ün makrofajların aşırı aktivasyonuna sebep olarak otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olabileceği, zayıf promotor özelliğindeki allel 2'nin ise infeksiyöz hastalıklara yatkınlığa sebep olabileceği fikri öne sürülmektedir [59,65]. Bu çalışmada incelenen bir diğer polimorfizm genin 15. eksonunda bulunmaktadır. Genin 15. eksonu proteinin sitoplazmik karboksil domeinini oluşturmaktadır. 543. kodonda aspartik asit amino asiti yerine asparagin (D543N) yer almasının genin işlevini değiştirebileceği ve böylece makrofajların fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. NRAMP1'in 3'UTR bölgesinde bulunan 4 nükleotidlik delesyon polimorfizminin ise proteinin işlevini nasıl değiştirebileceği tam olarak bilinmese de pek çok genin 3' uçlarında

düzenleyici elementlerin bağlandığı bölgeler olduğundan dolayı, bu polimorfizm üzerinde de çalışmalar yoğunlaşmaktadır. NRAMP1'in 4. intronundaki polimorfizm (469 G/A) alternatif kırılmaya neden olarak genin işlevini değiştirebileceğinden dolayı üzerinde çalışılan diğer bir polimorfizmdir. NRAMP1 geninde 4. intron içinde ekson 4a bölgesi de bulunmaktadır ve ekson 5'de sonlanma kodonu meydana gelerek kısa ve işlevsiz protein oluşturmaktadır. Makrofaj hücre serilerinde mRNA düzeyinde 1/5 oranında ekson 4a bulunan transkriptlerin bulunduğu bildirilmektedir. 4. introndaki polimorfizmin bu oranı değiştirebileceği ve böylece proteinin işlevini değiştirebileceği düşünülmektedir [1,58,67].

NRAMP1 işlevsel analizinin yapıldığı çalışmalara göre, NRAMP1'in bir membran proteini olduğu ve makrofajlarda endolizozomal kompartımana yerleşik olduğu belirlenmiştir [3]. Kesin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, özellikle demir alımını yönlendiren bir metal iyonu taşıyıcısı olarak görev yaptığı düşünülmektedir. İnfekte bireylerin makrofajlarının fagolizozomlarından demiri sitoplazmaya pompalayarak, fagolizozomlardaki bakterilerin gelişimi için esas olan demiri ortamdan uzaklaştırır ve hücre içi parazitlerin DNA'larının replikasyonlarını önler [60,61,62]. Bununla birlikte makrofaj aktivasyon yolunda da birçok immun mekanizmanın işleyişi üzerinde rolü bulunmaktadır [1,63]. NRAMP1'in bu işlevleri göz önüne alındığında, bir çok infeksiyöz ve otoimmun hastalığın etiyojisinde rol alan aday bir gen olabileceği düşünülmektedir. Böylece NRAMP1'in işlevini etkileyebileceği düşünülen polimorfizmlerin hastalıkların gelişiminde etkili olabileceği görüşü ortaya çıkmaktadır. Özellikle genin 5' promotor bölgesindeki genin farklı düzeylerde anlatımına sebep olan değişimlerden allel 2'nin infeksiyöz, allel 3'ün otoimmun hastalıklara yatkınlıktan sorumlu olabileceği ve evrimsel olarak da korunmuş bir protein olabileceği düşünülmektedir [1].

Bu çalışmada otoimmun ve infeksiyöz hastalıkların etiyojisinde rolü olabileceği düşünülen NRAMP1 genindeki, NRAMP1'in işlevini değiştirebileceği düşünülen 4 polimorfizmin Türk toplumunda romatoid artrit ve tüberküloz hastalığındaki olası rolleri araştırıldı.

Çalışmamızda, romatoid artrit ve kontrol grubunda elde edilen NRAMP1 polimorfizmlerinden 5' promotor bölgesinin analizinde, kontrol grubunda allel 3'ün frekansı % 81.58 iken, RA grubunda % 77.4 bulundu ve istatistiksel olarak bu farkın anlamlılık düzeyinde olmadığı görüldü ( $p=0.162$ ). INT4 polimorfizminin analizinde Allel C'nin frekansı RA grubunda % 21.93 iken, kontrol grubunda % 12.3 değerinde bulundu. RA grubunda Allel C frekansının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ( $p=0.005$ , %95 CI 1.20-2.77, O.R= 1.824). C allelini taşıyan bireylerin, C allelini taşımayan bireylere oranla, RA hastası olma riskinin 1.82 kat arttığı tespit edildi. Bu verilere göre Türk RA hastalarında Allel C'nin, hastalığın ortaya çıkmasında etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. RA ve kontrol grubunda D543N ve 3'UTR polimorfizmleri arasında bağlantı dengesizliği bulunduğu gözlemlendi. RA grubunda D543N A alleli/ 3'UTR delesyonlu allel frekansı % 4.08, kontrol grubunda % 1.8 olarak bulundu. Her ne kadar RA grubunda kontrol grubuna göre bu allelin frekansı yüksek olsa da, bu farkın istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde olmadığı görüldü ( $p=0.130$ ). Türk RA hastalarında NRAMP1 geninin analiz edilen polimorfizmleri arasında sadece INT4 polimorfizmi ile RA arasında anlamlı bağlantı olduğu gözlemlendi.

Bugüne kadar farklı popülasyonlarda NRAMP1 ve RA arasında bağlantı çalışmaları yapılmıştır. İngiltere'de 119 juvenil romatoid artrit hastası ve 111 sağlıklı kontrol grubunda yapılan NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesindeki polimorfizm analizinde Allel 3'ün sıklığının romatoid artrit grubunda kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunduğu ve anlamlı bağlantı olduğu bildirilmiştir [73].

İspanya'da 141 RA hastası ve 194 sağlıklı kontrol grubunda yapılan NRAMP1 geninin 5' promotor bölgesindeki polimorfizm analizi çalışmasında Allel 3 frekansının sağlıklı kontrol grubunda ve RA grubunda yaklaşık olarak aynı oranda bulunduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı gösterilmiştir [74].

Kore'de 74 RA ve 53 sağlıklı kontrol grubunda NRAMP1 geninin 5' promotor, D543N, 3'UTR ve INT4 bölgelerinin polimorfizmlerinin analizi çalışmasında, 5' promotor polimorfizmi ve INT4 polimorfizmi ile RA arasında anlamlı bir fark gözlenmediği, D543N polimorfizmi analizinde, RA grubunda Allel A frekansının, kontrol grubuna

oranla yüksek olduğu, ayrıca 3'UTR polimorfizmi analizinde de D543N polimorfizmine benzer şekilde RA'da delesyon alleli frekansının kontrol grubuna oranla yüksek olduğu ve anlamlılık bulunduğu bildirilmiştir [75].

Kanada'da 92 RA, 88 sağlıklı kontrol grubunda yapılan NRAMP1 geni polimorfizm çalışmasında 5' promotor ve INT4 polimorfizmleri ile RA arasında bağlantı bulunamazken, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri arasında bağlantı dengesizliği bulunduğu, D543N Allel A ve 3'UTR delesyon alleli sıklığının sağlıklı kontrol grubunda RA grubuna göre yüksek olduğu ve anlamlı bağlantı bulunduğu saptanmıştır [76].

Tayvan'da 113 RA, 74 sağlıklı kontrol grubunda yapılan NRAMP1 geninin D543N, 3'UTR ve INT4 polimorfizmlerinin analizinde, INT4 polimorfizmi ile RA arasında anlamlı bağlantı bulunmadığı, D543N polimorfizmi analizinde Allel A'nın, 3'UTR polimorfizmi analizinde delesyon allelinin kontrol grubunda RA grubuna oranla daha yüksek oranda olduğu ve D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ile RA arasında anlamlı bağlantı bulunduğu gösterilmiştir [77].

Çalışma sonuçlarımızı diğer popülasyonlarda yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda, İngiltere'de yapılan çalışma dışında diğer çalışmalarda bizim bulgularımıza benzer şekilde 5' promotor bölgesi allelleri ile RA arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ile RA arasında birbiriyle çelişen bulgular bulunmaktadır. Bizim bulgularımızın aksine Kore, Kanada ve Tayvan'da yapılan çalışmalarda D543N ve 3'UTR polimorfizmi ve RA arasında anlamlı bağlantılar bulunmuştur. Ancak Kore popülasyonunda 3' UTR delesyonlu allel oranı RA'da fazla oranda bulunurken, Kanada ve Tayvan popülasyonlarında 3' UTR delesyonlu allel RA'da kontrole göre daha düşük oranda bulunmakta ve koruyucu bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda da 3' UTR delesyonlu allel oranı Kore popülasyonunda olduğu gibi kontrol grubuna göre daha yüksektir ancak bu istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değildir. Kanada popülasyonunda da bizdekine benzer şekilde D543N ve 3'UTR arasında bağlantı dengesizliği olduğu bildirilmektedir. INT4 polimorfizmi ile RA arasında bir bağlantı bulunduğuna dair bir bulgu daha önce yayınlanmamıştır.

Aynı tip hastalığa sahip kişiler arasında hastalığın farklı şiddette gözlenmesinde kişiler arasındaki genetik farklılıkların rolü olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı RA'da aday bir gen olan NRAMP1 geninin polimorfizmlerinin de hastalığın bireyler arasında değişken şiddetlerde ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği düşünüldü. NRAMP1 polimorfizmleri ile RA hastalığının şiddeti arasındaki ilişkinin ortaya konması amacıyla, RA'nın hastalık şiddetinin göstergesi olan RF pozitifliği ve hastalarda erozyon bulunup bulunmaması özelliklerine göre alt gruplar oluşturuldu. Bu grupların analizinde RF pozitifliği ile polimorfizmler arasında anlamlı bir bağlantı olmadığı görüldü (5' promotor polimorfizmi analizinde  $p=0.499$ , INT4 polimorfizmi analizinde  $p=0.259$ , D543N/3'UTR polimorfizmi analizinde  $p=0.417$ ). Benzer şekilde hastalarda erozyon bulunması ile polimorfizmler arasında da anlamlı bir bağlantı olmadığı görüldü (5' promotor polimorfizmi analizinde  $p=0.418$ , INT4 polimorfizmi analizinde  $p=0.391$ , D543N/3'UTR polimorfizmi analizinde  $p=0.497$ ).

RA şiddeti ve NRAMP1 polimorfizmi arasında bağlantı kurmaya yönelik İspanya'da yapılan çalışmada, RA ile NRAMP1 polimorfizmi arasında anlamlı bağlantı bulunamazken, HLADR1 alleli taşıyan ve aynı zamanda NRAMP1 5' promotor 2/2 genotipine sahip bireylerde, bu alleli taşımayanlara göre küçük eklemlerde daha fazla erozyon bulunduğu bildirilmektedir [74]. Bizim çalışmamızda erozyon ve RF ile RA arasında anlamlı bir bağlantı bulunamadı ancak RA'da HLA bölgesi de etkili bir faktör olduğundan, aynı çalışma grubunda HLA tiplendirmesi de yapılarak HLA ve NRAMP1 geninin birlikteliğinin etkisine bakılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, tüberküloz grubunda NRAMP1 5' promotor bölgesi polimorfizminin analizinde, Allel 3'ün frekansı % 83.04, kontrol grubunda ise % 82.50 bulundu. Bu sonuçlara göre 5' promotor bölgesi polimorfizmi ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı olmadığı görüldü ( $p=0.444$ ). Tüberküloz grubunda INT4 polimorfizmi C alleli frekansı % 15.62, kontrol grubunda ise % 11.8 oranında bulundu. Tüberküloz grubunda C alleli frekansı kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte bu farkın anlamlılık düzeyinde olmadığı görüldü ( $p=0.337$ ). Tüberküloz ve kontrol grubunda da D543N ve 3'UTR polimorfizmi arasında bağlantı dengesizliği olduğu görüldü. Kontrol grubunda D543N A alleli/ 3'UTR delesyonlu allelin frekansı % 0.62 iken tüberküloz grubunda %

1.95 oranında bulundu ve tüberküloz ile bu polimorfizmler arasında anlamlı fark bulunmadığı belirlendi ( $p=0.286$ ).

Tüberküloz ve NRAMP1 polimorfizmleri arasında bağlantı kurmaya yönelik pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Batı Afrika'da Gambiya popülasyonunda 410 tüberküloz ve 417 sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmada NRAMP1 geninin 4 polimorfik bölgesi ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantılar bulunduğu bildirilmiştir [78].

Japonya'da 95 tüberküloz, 90 sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmada INT4, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ile tüberküloz arasında anlamlı bir bağlantı bulunmadığı bildirilmiştir [79].

Rusya'da 58 tüberküloz hastası, 127 sağlıklı kontrol grubunda yapılan INT4 polimorfizmi analizinde anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır [80].

Danimarka'da 104 tüberküloz hastası ve 176 kontrol grubunda yapılan çalışmada 5'promotor, INT4, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunamadığı gösterilmiştir [1].

Çin'de 127 tüberküloz hastası ve 91 sağlıklı kontrol grubunda yapılan D543N ve INT4 polimorfizm çalışmasında, bu bölgeler ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunmadığı bildirilmiştir [80]. Buna karşılık Çin'de 278 tüberküloz hastası ve 282 kontrol grubunda yapılan markır çalışmasında, D543N ve 3'UTR bölgesini kapsayan SLC6a/b markır bölgesi ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunduğu bildirilmiştir [81].

Tayland'da 149 tüberküloz ve 147 sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmada INT4, D543N ve 3'UTR polimorfizmleri ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunamamıştır [83].

Peru'da 507 tüberküloz hastası ve 507 kontrol grubunda yapılan çalışmada INT4 ve D543N polimorfizmleri ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunurken 3'UTR polimorfizmi ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir [84].

Japonya, Rusya, Danimarka ve Çin'de yapılan çalışmaların sonuçları ile çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Afrika ve Peru'da yapılan çalışmalarda ise anlamlı bulunan polimorfizmler bildirilmektedir. Afrika'da yapılan çalışmada 4 polimorfik bölge ile de anlamlı farklar bulunmuş, Peru'da yapılan çalışmada ise INT4 ve D543N polimorfizmleri ile bağlantı tespit edilmiştir. Yine Çin'de yapılan bir çalışmada da D543N ve 3'UTR bölgesini temsil eden markırla hastalık arasında bağlantı tespit edilmiştir.

Tüberküloz grubunda, akciğer tüberkülozlu hastalar ile akciğer dışı tüberküloz hastalar gruplandırılarak analiz edildiğinde, NRAMP1 polimorfizmleri ile tüberküloz tipi arasında anlamlı bir bağlantı bulunmadığı görüldü (5' promotor polimorfizmi analizinde  $p=0.804$ , INT4 polimorfizmi analizinde  $p=0.957$ , D543N/3'UTR polimorfizmi analizinde  $p=0.740$ ).

Peru'da yapılan çalışmada akciğer tüberkülozlu olgularda INT4 ve D543N polimorfizmi arasında bağlantı bulunurken, akciğer dışı tüberkülozlu olgularda bağlantı saptanamamıştır [84]. Bizim çalışmamızda ise Peru'da elde edilen sonuçların aksine hem akciğer hem de akciğer dışı tüberkülozlu grupta anlamlılık tespit edilemedi. Çin [81] ve Danimarka'da [1] yapılan çalışmalarda NRAMP1 polimorfizmleri ile tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunamamış ancak mikroskopik incelemelerde tüberküloz pozitif bulunan ve negatif bulunan olgular kıyaslandığında, tüberküloz mikroskopik pozitif olanlarda anlamlılık olduğu bildirilmiştir.

Özellikle 5' promotor bölgesindeki allel 3' ün otoimmün, allel 2'nin infeksiyöz hastalıkların ortaya çıkmasında etkili bir faktör olabileceği hipotezini ve aynı tip allellerin hem infeksiyöz hem de otoimmün hastalığa sebep olup olmayacağını istatistiksel olarak daha net olarak ortaya koymak için, RA ve tüberküloz gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımızda yine anlamlı bir fark gözlenmedi (5' promotor polimorfizminin analizinde  $p= 0.446$ , INT4 polimorfizminin analizinde  $p= 0.259$ , D543N/3'UTR polimorfizmlerinin analizinde  $p= 0.424$ ).

RA ve tüberküloz hastalıkları ile NRAMP1 polimorfizmleri arasında bağlantıyı araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda ırklar ve etnik gruplar arasında NRAMP1 polimorfizmlerinin oldukça değişken olduğu göze çarpmaktadır. D543N Allel A frekansları açısından farklı populasyonlar karşılaştırıldığında, Kore'de % 4 [75], Kanada'da % 7.6 [76], Çin'de % 9 [81], Tayland'da % 17 [83], Peru'da % 14 [84], Afrika'da % 10 [78] sıklıkta, Türkiye'de % 1.2 sıklıktadır. Bu farklar ırklar arasında NRAMP1 polimorfizmlerinin sıklıklarının toplumlara özgü olarak değişkenlik gösterdiğine işaret etmektedir. Aynı zamanda bu gen farklılığına çevre koşullarının etkisinin eklenmesiyle birlikte toplumlara özgü olarak hastalıkların görülme oranları da değişmektedir. Ayrıca bir toplumda hastalığın çıkmasında etkili olan bir allel başka bir toplumda hastalığın çıkmasında koruyucu bir faktör olarak da karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle bu tür çalışmalar toplumlara özgü olarak yapılmalıdır.

Bu çalışmada, Türk RA hastaları için INT4 C allelini taşıyan bireylerin taşımayanlara oranla 1.8 kat daha fazla risk taşıdığı belirlendi. 5'promotor polimorfizmi ile hem RA hem de tüberküloz arasında anlamlı bağlantı bulunamadı ancak Zaahl ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, NRAMP1 geninin -237 bölgesinde C nükleotidinin T nükleotidine dönüştüğü bireylerde, genin yüksek oranda anlatımından sorumlu olan allel 3'ün, allel 2 gibi düşük düzeyde anlatım yaptığı bildirilmektedir [85]. Bu bulgulara göre 5'promotor bölgesinin analizini takiben bundan sonraki çalışmalarda -237 bölgesinin de analizinin yapılarak, bu iki bölgenin verilerinden haplotip analizi yapılması gerekmektedir. Ayrıca D543N ve 3' UTR arasında bağlantı dengesizliğinin saptanması, toplumumuzda farklı otoimmün veya infeksiyöz hastalıklarda yapılacak olan NRAMP1 geni ile bağlantı çalışmalarında sadece 3'UTR veya D543N bölgesine bakmanın yeterli olacağı sonucuna varılabilir. ARMS-PZR ile çalışılan 3 polimorfik bölgenin sonuçlarının doğruluğunun REA ile kanıtlanması nedeniyle, bundan sonra gerçekleştirilecek olan bu üç bölgenin analizi çalışmalarında zaman ve masraftan tasarruf sağlayan ARMS-PZR'nin kullanılmasının yeterli olabileceği düşünülmektedir.

RA ve tüberküloz hastalığında rol oynayan aday genlerden biri olan NRAMP1 geni ile bağlantı gösterebilecek diğer aday genler de toplumumuzda analiz edilmeli ve kişilerin genotipleri ile tedaviye verdikleri cevap arasındaki bağlantılar araştırılmalıdır. Bu sonuçların toplumumuzda yapılan başka çalışmalarla da doğrulanması gerekmektedir.

Bu tip çalışmalar, romatoid artrit ve tüberkuloz patogenezi ve konak savunmasında kullanılan mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunacağı gibi, ilaç geliştirilmesinde yeni farmakolojik hedeflerin ortaya konulmasında, yeni ve etkinliği daha yüksek olan aşıların geliştirilmesinde de yardımcı olacaktır. Romatoid artrit ve tüberkuloza yatkınlık üzerine etkili olan genetik faktörlerin, farklı populasyonlarda değişkenlik göstermesi nedeniyle, bu faktörlerin çeşitli populasyonlarda belirlenmesi bu gelişmeleri hızlandıracaktır. Riskli grupların ortaya konması; davranış şekilleri, seyahat alışkanlıkları, proflaktik ilaç kullanımı ve aşi uygulamalarında yeni yaklaşımların belirlenmesini sağlayabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. BLACKWELL, J.M., SEARLE, S., GOSWAMI, T., MILLER, E.N., 2000, Understanding the multiple functions of Nramp1, *Microbes and Infection*, 317-321.
2. ABEL, L., DESSEIN, A.J., 1997, The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases, *Current Opinion Immunology*, 9:509-16.
3. SEARLE, S., BRIGHT, N.A., ROACH, T.I.A., ATKINSON, P.G.P., BARTON, C.H., MELOEN, R.H., BLACKWELL, J.M., 1998, Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science*, 111:2855-2866.
4. YAZICI, H., 1982, Romatoid Artrit, Turan, N., ed., *Romatizmal Hastalıklar*, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, 314-337.
5. WILDLER, RL., 1993, Rheumatoid Arthritis, Epidemiology, Pathology and Pathogenesis. In: *Primer on the Rheumatic Diseases*, Schumacher, RH., eds, Arthritis Foundation, Atlanta, 86-89.
6. FELSON, TD., 1997, Epidemiology of The Rheumatic Diseases, In: *Arthritis and Allied Conditions* Mc Carty, Dj., Kopman, Wj., eds, Williams and Wilkins, Baltimore, 3-34.
7. ALBANI, S., CARSON, D.A., 1997, Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, In: *Arthritis and Allied Conditions*, Mc Carty, D.J., Kopman, W.J., eds, Williams and Wilkins, Baltimore, 979-992.
8. FIRESTEIN, G.S., 1997, Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, In: *Textbook of Rheumatology*, Kelley, W.N., Haris, E.D., Ruddy, S., Sledge, Cb., eds, WB Saunders, Philadelphia, 851-897.
9. GÜL, A., 2002, Genetik, Hamuryudan, V., ed., *Romatoid Artrit*, MD Yayıncılık, Ankara, 1-7.
10. JAWAHEER, D., THOMSON, W., MACGREGOR, A.J., 1994, Homozygosity for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins, *Arthritis Rheumatology*, 37:681-686.

11. OLLIER, W., 2000, Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy?. *Ann Rheum Dis*, 59:497-499.
12. AIBANI, S., RAVELLI, A., MASSA, M., DE BENEDETTI, F., ANDREE, G., ROUDIÉ, J., et al., 1994, Immune responses to the *Escherichia coli* dnaJ heat shock protein in juvenile rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity. *J Pediatr*, Apr:124(4):561-5.
13. GREGERSEN, P.K., SILVER, J., WINCHESTER, R.J., 1987, The shared epitope hypothesis: An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatology*, 30:1205-1213.
14. McLEAN, L., WINROW, V., BLAKE, D., 1990, Role of immunity to mycobacterial stress proteins in rheumatoid arthritis. *J Exp Pathol*, 71(2):295-303.
- 15- AHO, K., KOSKENVUO, M., TUOMINEN J., 1986, Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins, *J Rheumatology*, 13:899-902.
16. CRISWELL, LA., AMOS, CI., 2000, Update on genetic risk factors for SLE and rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatology*, 12:85-90.
17. DEIGHTON, CM., WALKER, DJ., GRIFFITHS, ID., 1989, The contribution of HLA to rheumatoid arthritis, *Clinical Genetics*, 36:178-182.
18. MACGREGOR, AJ., OLLIER, W., THOMSON, W., 1995, HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset and disease severity, *Journal of Rheumatology*, 22:1032-1036.
19. ZHONG, M., TRACEY, K.J., 1998, Tumour necrosis factor. In: *The Cytokine Handbook*, Thompson A, ed 3rd ed. San Diego, CA: Academic Pres 517-548.
20. M, FIELD., 2001, Tumour necrosis factor polymorphisms in rheumatic disease, *Journal of Medicine*, 94:237-246.
21. ANNE, C., NICOLA, M., HILARY A, CAPELL., RAJAN, MADHOK., 2000, Predictive value of interleukin 1 gene polymorphisms for surgery, *Annual Rheumatic Disease*, 59:695-699.
22. KHANI-HANJANI, A., HOAR, D., HORSMAN, D., LACAILE, D., CHALMERS, A., KEOWN, P., 2001, Identification of four novel dinucleotide repeat polymorphisms in the IL-2 and IL-2 $\beta$  receptor genes, *Human Immunology*, 62:368-370.
23. YAMADA, R., TANAKA, T., UNOKI, M., NAGAI, T., SAWADA, T., OHNISHI, Y., et al., 2001, Association between a single nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease, *American Journal of Genetics*, 68(3):674-685.

24. BUCHS, N., SILVESTRI, T., DIGIOVINE, F.S., CHABAUD, M., VANNIER, E., DUFF, G.W., 2000, IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction, *Rheumatology*, 39:1126-1131.
25. PAWLIK, A., WRZESNIEWSKA, J., FLORCZAK, M., GAWRONSKA-SZKLARZ, B., HERCZYNSKA, M., 2005, The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology Int*, 26:48-51.
26. LEIGH J, KEEN., 2002, The study of polymorphism in cytokine and cytokine receptor genes, *ASHI Quarterly*, 152-154.
27. GONZALES-GAY, M.A., HAJEER, A.H., GARCIA-PORRUA, C., DABABNEH, A., AMOLI, M.M., BOTANA, M.A., et al., 2003, Corticotropin-releasing hormone promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis from northwest Spain, *Journal of Rheumatology*, 30(5):913-917.
28. LOBUE, P.A., 2001, Tuberculosis: epidemiology and prevention. In: *Manual of Clinical Problems in Pulmonary Medicine*, Bordow, R.A., Ries, A.L., Morris, T.A., eds., 5th ed. Philadelphia, Lipincot Williams&Wilkins, 155-159.
29. KILIÇASLAN, Z., 2002, Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Uzun, Ö., Ünal, S., ed., *Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları*, Bilimsel Tıp, Ankara, 821-834.
30. Global Tuberculosis Control, WHO Report 2006, [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2006/pdf/full\\_report\\_correctedversion.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/pdf/full_report_correctedversion.pdf) [23.03.2007]
31. CONNOLLY, MA., CHAULET, P., RAVIGLIONE MC., 1997, Epidemiology of tuberculosis. In: Tuberculosis. Wilson R, ed., *Eur Respir Mon*, 4:51-67.
32. AYSAN, T., 2003, *Akciğer tüberkülozu*, Türkiye Klinikleri, 1-57.
33. SUDRE, P., DAM, G.T., KOCHI, A., 1992, Tuberculosis: a global overview of the situation today, *Bulletin of World Health Organization*, 70:149-159.
34. World Healty Organization. Tuberculosis Fact Sheet, 2007, *World Healty Organization*, [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2007/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/) [24.02.2007].
35. SMITH, K.C., 2000, Tuberculosis exposure in a day care center: recommended management, *South Medical Journal*, 93:877-880.
36. ÖZDEMİR N., 1998, Akciğer tüberkülozu, Barış, Y.İ., ed., *Akciğer Hastalıkları*, Atlas Kitapçılık, Ankara, 137-173.

37. ÖZKARA, Ş., AKTAŞ, Z., ÖZKAN, S., ECEVİT, H., 2003, *Türkiye’de Tüberküloz Kontrolü için Başvuru Kitabı* Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Rekmay Ofset, Ankara.
38. GÜMÜŞLÜ, F., ÖZKARA, Ş., ÖZKAN, S., BAYKAL, F., GÜLLÜ, Ü., 2007, *Türkiye’de Verem Savaşı Raporu*, Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı, Ankara.
39. SMITH, I., NATHAN, C., PEAVY, HH., 2005, Progress and New Directions in Genetics of Tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med*, 172:1491–1496.
40. KARAHAN, C.Z., AKAR, N., 2002, Tüberküloza Genetik Yatkınlık, *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, Ankara, 2(55):151-162.
41. SELVARAJ, P., Host genetics and tuberculosis susceptibility, 2004, *Current Science*, 86:1-10.
42. BELLAMY, R., HILL, A.V.S., 1998, Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans, *Current Opinion Immunology*, 10:483-87.
43. BELLAMY, R., 2000, Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans:a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen, *Clinical Science*, 98:245-250.
44. MARQUET, S., SCHURR, E., 2001, Genetics of susceptibility to infectious diseases. Tuberculosis and Leprosy as examples, *Drug Met Disp*, 29:479-83.
45. TURNER, M.W., 1996, Mannose Binding Lectin: The pluripotent molecule of the innate imune system, *Immunology Today*, 17 (11):532-40.
46. SELVERAJ, P., NARAYONAN, P.R., REETHA, A.M., 1999, Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India.Tuberculosis, *Lung Diseases*, 79 (4):221-27.
47. BELLAMY, R., RUWENDE, C., MCADAM, K., 1998, Mannose Binding Protein deficiency is not associated with increased susceptibility to Malaria, Hepatitis B nor Tuberculosis in Africans, *QJM*. 91:13-18.
48. HOAL, VAN., HELDEN, E.G., EPSTEIN, J., VICTOR, T.C., 1999, Mannose Binding Protein B allele confers protection against Tuberculous meningitis, *Pediatric Respiratory*, 45 (4):459-64.
49. CRUSE, J.M., LEWIS, R.E., 1999, *Atlas of Immunology*, CRC Press LLC and Springer Company, 108-117.
50. STREITER, R.M., KUNKEL, S.L., BONE, R.C., 1993, Role of Tumor Necrosis Factor:in disease states and inflammation, *Crit Care Med*, 21 (10):447-63.

51. QUASNEY, M.W., BRONSTEIN, DE., CANTOR, R.M., 2001, Increased frequency of alleles associated with elevated Tumor Necrosis Factor-alpha levels in children with Kawasaki disease, *Pediatric Research*, 49 (5):686-90.
52. JONGENEEL, C.V., BRIANT, L., UDALOVA, I.A., 1991, Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 9717-21.
53. KIM, H.K., HAN, H., CHOI, H.B., 2000, Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans, *Human Immunology*, 61(12):1274-80.
54. OPPENHEIM, J.J., RUSCETTI, F.W., 1997, Cytokines. In: *Medical Immunology*, STITES, D.P., TERR, A.I., PARSLOW, T.G., eds., 9th ed. Connecticut: Appleton and Lange, 146- 152.
55. WILKINSON, R.J., PATEL, T., LLEWELYN, M., 1999, Influence of polymorphism in the genes for the Interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta on Tuberculosis, *Journal of Experimental Medicine*, 189(12):1863-73.
56. BELLAMY, R., RUWENDE, C., CORRAH, C., 1998, Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis Lung Diseases*, 79(2):83-89.
57. MALO, D., VOGAN, K., VIDAL, S., HU, J., CELLIER, M., SCHURR, E., et al., 1994, Haplotype mapping and sequence analysis of mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites, *Genomics*, 23:51-61.
58. CELLIER, M., GOVANI, G., VIDAL, S., KWAN, T., GROULX, N., LIU, J., et al., 1994, Human Natural resistance-associated macrophage protein:cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression, *Experimental Medicine*, 180:1741-1752.
59. BLACKWELL, J.M., BARTON, C.H., WHITE, J.K., SEARLE, S., BAKER, A.M., WILLIAMS, H., SHAW, M.A., 1995, Genomic organization and sequence of human NRAMP gene: identification and mapping of promoter region polymorphism, *Molecular Medicine*, 1(2):194-205.
60. FLEMING, M.D., TRENOR, C.C., SU, M.A., FOERNZLER, D., BEIER, D.R., DIETRICH, W.F., ANDREWS, N.C., 1997, Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene, *Nature Genetic*, (16):383-386.
61. BRUCE, S.W., DONALD, E.K., LISA, W., DAVID, B., WILLIAM, L., 1999, Role of Iron in Nramp1-Mediated Inhibition of Mycobacterial Growth, *Infectious. Immunity*, 1386-1392.
62. NATHON, N., 1999, Metal ion transporters and homeostasis, *The EMBO Journal*, 18(16):4361-71.

63. BELLAMY, R., 1999, The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens, *Microbes and Infection*, 23-27.
64. McNICHOLL, J.M., 1998, Host genes and infectious diseases, *Emergency Infectious Disease*, 4(3):423-26.
65. SEARLE S., BLACKWELL, J.M., 1999, Evidence for functional repeat polymorphism in the promoter of human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility, *Journal of Medical Genetic*, 36:295-299.
66. TEFLER, J.F., BROCK, J.H., 2002, Expression of ferritin, transferrin receptor, and non-specific resistance associated macrophage proteins 1 and 2 (Nramp1 and Nramp2) in the human rheumatoid synovium, *Annual Rheumatic Disease*, 61:741-744.
67. KAZUNOBU, O., YOICHI, S., TARO, S., FUMIO, K., 2003, Polymorphism of SLC11A1 (Formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease, *The Journal of Infectious Diseases*, 187:326-329.
68. GRAHAM, A.M., DOLLINGER, M.M., SEM, H., HARRISON, D.J., 2000, Identification of novel alleles at a polymorphic microsatellite repeat region in human NRAMP1 gene promoter:analysis of allele frequencies in primary biliary cirrhosis, *Journal of Medical Genetic*, 37:150-152.
69. CANONNE-HERGAUX, F., CALAFAT, J., RICHER, E., CELLIER, M., GRINSTEIN, SERGIO., BORREGAARD, N., GROS, PHILIPPE., 2002, Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules, *Blood*, 100:268-275.
70. MILLER S.A, DYKES D.D, POLESKY, HF., 1988, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res* 16:1215-1217.
71. NEWTON, C.R., GRAHAM, A., HEPTINSTALL, L.E., POWELL, S.J., SUMMERS, C., KALSHEKERL, N., et al., 1989, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17:2503-2516.
72. CHRISTIAN, SOBORG., AASE, B., ANDERSEN, HANS, O., MADSEN, AXEL., KOK, JENSEN., PETER, SKINHOJ., PETER, GARRED., 2002, Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 Polymorphism Are Associated with Microscopy-Positive Tuberculosis, *The Journal of Infectious Diseases*, 186:517-521.
73. SANJEEVI, C.B., MILLER, E.N., DABADGHAO, P., RUMBA, I., SHTAUVERE, A., DENISOVA, A., et al., 2000, Polymorphisms at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis., *Arthritis & Rheumatism*, 43:6:1397-1404.

74. RODRÍGUEZ, M.R., GONZA'LEZ-ESCRIBANO M.F., AGULIAR, F., VALENZUELA, A., GARCI'A, A., NUNEZ-ROLDAN, A., 2002, Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with the susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 59:311–315.
75. YANG, Y.S., KIM S.J., KIM, J.W., KOH, E.M., 2000, NRAMP1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Koreans. *J Korean M Sci*, 15:83-87.
76. SINGAL, D.P., Li, J., ZHU, Y., ZHANG, Y., 2000, NRAMP1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis, *Tissue Antigens*, 55:44–47.
77. YEN, J.H., LIN, C.I., TSAI, W.C., OU, T.T., WU, C.C., H.U C.J., 2006, Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis, *Immunology Letters*, 102:91–97.
78. BELLAMY, R., RUWENDE, C., CORRAH, T., McADAM, K.P.W.J., WHITTLE, H.C., HILL. A.V.S., 1998, Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in west africans. *N Engl J Med*, 338:640-644.
79. ABE, T., LINUMA, Y., ANDO, M., YOKOYAMA, T., YAMAMOTO, T., NAKASHIMA., et al., 2003, NRAMP1 Polymorphisms, Susceptibility and Clinical Features of Tuberculosis, *Journal of Infection*, 46:215-220.
80. PUZYREV, V.P., FREIDIN, M.B., RUDKO, A.A., STRELIS, A., KOLOKOLOVA, K.O.V., 2002, Polymorphisms of Tuberculosis Susceptibility Candidate Genes in the Slavonic Population of Siberia: A Pilot Study, *Molecular Biology*, 36:5:634–636.
81. ZHANG, W., SHAO, L., WENG, X., HU, Z., JIN, A., CHEN, S., et al., 2005, Variants of the Natural Resistance–Associated Macrophage Protein 1 Gene (NRAMP1) Are Associated with Severe Forms of Pulmonary Tuberculosis, *Clinical Infectious Diseases*, 40:1232–1236.
82. LEUNG, K.H., SHEA, P.Y., WA, S.W., LAP, S.Y., KAM, K.C., WAI, M.L., et al., 2007, Sex- and age-dependent association of *SLC11A1* polymorphisms with tuberculosis in Chinese: a case control study. *BMC Infectious Diseases*, 7:19-28.
83. VEJBAESYA, S., CHIERAKUL, N., LUANGTRAKOOL, P., SERMDUANGPRATEEP, C., 2007, NRAMP1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais, *Respirology* 12:202–206.
84. TAYPE, C.A., CASTRO, J.C., ACCINELLI, R.A., HERRERA-VELIT, P., SHAW, M.A., ESPINOZA, J.R., 2006, Association between SLC11A1 polymorphisms and susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. *Infection, Genetics and Evolution*, 6:361–367.

85. ZAAHL, M.G., ROBSON, K.J.H., WARNICH, L., KOTZE, M., 2004, Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: Opposite effect in the presence of -237C-T, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 33:45-50.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### ÖMER ATEŞ

27/09/1975 yılında Kayseri’de doğdu. Kayseri Yavuz Selim İlkokulu’ndan mezun oldu. Orta ve lise öğrenimini Kayseri Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 1993 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’ne başlayıp, 1997 yılında mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik programına girip, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genetik ve Teratoloji Araştırma Merkezi’nde ‘Trombozlu Hastalarda Protein C Geninde Mutasyon Taraması’ başlıklı tez çalışmasını 2001 yılında tamamladı. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik doktora programına kayıt yaptırmış olup halen doktorasına devam etmekte ve araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.