

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NF-KB, TLR-4 VE TLR-2 VARYASYONLARININ GLİOMA
İLE İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ARŞ. GÖR. İDRİS KINA

**DANIŞMAN
PROF. DR. TURGUT ULUTİN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İDRİS KINA

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, insani ve ahlaki değerleriyle de örnek edindiğim, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı, danışmanlığımı üstlenen saygıdeğer hocam PROF. DR. TURGUT ULUTİN'e, u süreçte beni kendi öğrencilerinden ayırmayan, desteğiyle ve üzerimdeki emeğiyle bende minnet duygusu uyandıran değerli hocam PROF. DR. GÖNÜL KANIGÜR'e ve tüm kıymetli hocalarımıza, Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm arkadaşlarımdan; eşsiz bilgilerini benimle paylaşan, yalnızca eğitim sürecinde değil hayata dair de yol göstericim olarak yeri geldiğinde bana abilik yapan, bu süre zarfında en büyük kazançlarımdan biri olan kıymetli abim ARŞ. GÖR. DR. BAHADIR BATAR'A ve DR. GÜVEN YENMİŞ'e, laboratuvar çalışmalarında bana dert ortağı olan ve yardım eden TUBA SOYDAŞ'a ve daha ismini yazamadığım tüm arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glial Hücreler ve Gliomalar	3
2.1.1. Normal Glial Hücreler.....	3
2.1.2. Astrositler	4
2.1.3. Oligodendrositler	6
2.2. Ependimal Hücreler	8
2.3. Gliomalar	8
2.3.1. Astrositomalar.....	9
2.3.2. Oligodendrogliomalar.....	11
2.3.3. Ependimomalar.....	11
2.4. Glial Tümörler ve Moleküler Düzensizlikler	11
2.5. Gliomagenez.....	15
2.6 Nükleer Faktör-kappa B (NF-kB) Ailesi	21
2.6.1. NF-kB Tarafından Düzenlenen Genler.....	23
2.6.2. NF-kB Aktivasyonunun Hücre Biyolojisine Etkileri.....	26
2.6.3. Nükleer Faktör-κB (NF-κB) Transkripsiyon Faktörü Ailesi.....	28
2.6.4. NF-κB Proteinlerinin Yapısal Olarak İncelenmesi.....	28
2.6.5. NF-κB Dimerlerinin Oluşumu ve DNA'ya Bağlanması.....	30
2.6.6. Nükleer faktör-kappaB1 (NF-kB1).....	34

2.6.7. NF-kB1 İnsersiyon/delesyon -94 ATTG Polimorfizm	35
2.7. Toll Like Reseptörler	35
2.7.1. Tarihçesi	35
2.7.2. Toll Like Reseptörler (TLR)	36
2.7.3. TLR'nin Yapısı ve Fonksiyonu	39
2.7.4. TLR-2 Geni ve Fonksiyonu	41
2.7.5. TLR-4	43
2.7.6. Toll like Reseptör Yolağı	44
2.7.7. TLR Aracılı Sinyalizasyon	48
2.7.8. TLR ve Kanser ilişkisi	49
2.7.9. TLR Polimorfizmi	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Gereç	51
3.1.1. Materyal	51
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	52
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	52
3.1.4.1. Nükleotid Karışımı	52
3.1.4.2. Primer Stok Çözeltisi	53
3.1.4.3. 5 x TBE Tamponu	53
3.1.4.4. 0,5 x TBE Tamponu	53
3.1.4.5. Etidyum Bromid (EtBr) (10mg/ml)	53
3.1.4.6. % 2 Agaroz Jel Çözeltisi	54
3.1.4.7. % 3 Agaroz Jel Çözeltisi	54
3.2. Yöntem	54
3.2.1. DNA İzolasyonu	54
3.2.2. Roche DNA kiti ile DNA İzolasyon Protokolü	54
3.2.3. DNA Saflığının ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi	55
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	55
3.2.5. PZR Reaksiyon Karışımı	56
3.2.5.1. <i>NFKB1</i> -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı	56
3.2.5.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı	57
3.2.5.3. TLR-4 Asp299G1y Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı	59

3.2.5.4. TLR-4 Thr399İle Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı	60
3.3. AgaroZ Jel Elektroforezi	61
3.3.1. AgaroZ Jelin Hazırlanması	61
3.3.2. PZR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	62
3.3.4. Restriksiyon Enzim Kesimi	62
3.3.4.1. <i>NFKB1</i> -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi	62
3.3.4.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi	63
3.3.4.3. TLR-4 Asp299G1y Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi	63
4. BULGULAR	65
4.1. <i>NFKB1</i> -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için Genotip Tayini	65
4.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için Genotip Tayini	65
4.3. TLR-4 Asp299Gly Polimorfizmi için Genotip Tayini	66
4.4. TLR-4 Thr399İle Polimorfizmi için Genotip Tayini	67
4.5. Bulguların Analizi	68
4.5.1. İstatistiksel Sonuçlar	68
5. TARTIŞMA	70
KAYNAKLAR	73
ETİK KURUL KARARI	89
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Astrositomaların Derecelere Göre Taşıdıkları Moleküler Özellikler.....	15
TABLO 2-2: NF-KB Tarafından Düzenlenen İmmün Sistem Elemanları.....	25
Tablo 2-3 : TLR'nin Endojen ve Ekzojen Ligandları ile Sentezini İndüklediği İnflamatuvar Mediatorler.....	41
Tablo 2-4: TLR Ailesi ve Ligandları.....	43
Tablo 2-5: Tümörlerle İlişkili TLR Tipleri.....	49
Tablo 3-1: Primer Dizileri	53
Tablo 3-2: NFKB1 - 94 ins/del ATTG Polimorfizmi için PZR Karışımı.....	56
Tablo 3-3: <i>NFKB1</i> - 94 ins/del ATTG Polimorfizmi için PZR Programı.....	57
Tablo 3-4: TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için PZR Karışımı.....	58
Tablo 3-5: TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için PZR Programı.....	58
Tablo 3-6: TLR-4 Asp299Gly Polimorfizmi için PZR Karışımı.....	59
Tablo 3-7: TLR-4 Asp299Gly Polimorfizmi için PZR Programı.....	60
Tablo 3-8 : TLR-4 Thr399Ile Polimorfizmi için PZR Karışımı.....	61
Tablo 3-9: TLR-4 Thr399Ile Polimorfizmi için PZR Programı.....	61
Tablo 3-10: <i>NFKB1</i> - 94 ins/del ATTG Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi için Reaksiyon Koşulları	62
Tablo 3-11: TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi için Reaksiyon Koşulları.....	63
Tablo 3-12: TLR-4 Asp299Gly Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi için Reaksiyon Koşulları.....	64
Tablo 4-1 Glioma ve kontrol Gruplarındaki Genotip ve Allel Sıklığı Dağılımları.....	68
Tablo 4-2 A: NF-KB+ TLR-2 Arg753Gln Kombine Genotip Dağılımları.....	69
Tablo 4-2 B: NF-KB+ TLR-4 Asp299Gly Kombine Genotip Analizi.....	69
Tablo 4-2 C: NF-KB+ TLR-4 Thr399Ile Kombine Genotip Analizi.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Bir nöroglia hücresi genel şekli (FALCHETTI A, 1999).....	3
ŞEKİL 2-2 :A) FİBRÖZ ASTROSİTLERİN ISIK MİKROSKOBUNDAKİ GÖRÜNTÜSÜ (FALCHETTI A,1999) B)ASTROSİTLERİN SEMATİK ŞEKİLLERİ (FALCHETTI A,1999) C) KAN-BEYİN BARIYERİNDE ASTROSİTLER (COSAN E, 2004).....	5
Şekil 2-3: Nöroglia hücrelerinin beyinde yerleşimi.....	6
Şekil 2-4: A) Oligodendrositin sematik çizimi (GARTNER L.P, 1997)B) Nöron hücresi (BASARAN A., 2005).....	7
Şekil 2-5: Kültürde Astrositoma Hücreleri.....	9
Şekil 2-6: Astrositler (yeşil renkli hücreler) ve Oligodendrositler (aksonların çevrelerinde yerleşen sarı taralı alanla gösterilen hücreler)	13
Şekil 2-7: Normal hücre ve kanser hücresinin onkogenik strese verdikleri cevaplar. Dış veya iç kaynaklı stres durumunda normal hücre, DNA tamiri ve programlı hücre ölümü mekanizmalarını aktif duruma getirirken, kanser hücresi hücre döngüsü durdurulması ve apoptoz gerçekleştiremediğinden genomik kararsızlığına rağmen yaşamına devam eder (Merlo A., 2003).....	17
Şekil 2-8: Glial Destek Dokusunu Oluşturan Hücre Tipleri ve Yerleşimleri.....	18
Şekil 2-9: Glial Hücrelerin Embriyonik Gelişimi. Şekilde glial tanımlanmış öncüllerin büyüme faktörleri etkisiyle embriyonik günler 8, 13, 18’ de değişimleri görülmektedir (Merlo A., 2003).....	19
Şekil 2-10 : Embriyonik gelişim sırasında kök hücreler, büyüme faktörleri etkisi altında ventriküler katmandan subventriküler, intermediate katmana ve neokortekse göç edişleri sırasında farklılaşarak nöronları (yeşil), oligodendrositleri (sarı) ve astrositleri (kırmızı) oluştururlar (Andrea J.,2001 ve) Ding H.,2000).....	20
Şekil 2-11: Astrositomaların gelişimi hipotezleri (Konopka G., 2003).....	21
Şekil 2-12: NF-kB protein aileleri’nin üyeleri (Memeli hücrelerinde 5 adet nükleer faktör (NF)-kB üyesi bulunmaktadır. RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-kB1) ve p52/p100 (NF-kB2).....	23
Şekil 2-13: NF-kB Tarafından Düzenlenen Genler.....	26
Şekil 2-14: NF-kB’nin Aktivasyonu (David A, 2001).....	27
Şekil 2-15: NF-kB Aktivatörleri ve Etki Yerleri (David A, 2001)	28

Şekil 2-16: NF- κ B alt birimlerinin genel yapısı. RHD, Rel homoloji bölgesi; TAD, transkripsiyonal aktivasyon bölgesi; LZ, lösin fermuarı motifi; GRR, glisin amino asidi bakımından zengin bölge; ANK, ankirin tekrarları bölgesi. Translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonlardan P, Fosforilasyon; Ac, Asetilasyon ve Ub, Ubikütinasyon. Vallabhapurapu ve Karin (Vallabhapurapu,2009)'den alınmıştır.....	29
Şekil 2-17: NF- κ B'nin Rel homoloji bölgesi ve dimer oluşumu. A, NF- κ B p50 alt biriminin RHD yapısı; B, p50 (yeşil) ve RelA (kırmızı) alt birimlerinin oluşturduğu dimer yapısı; C, RelB homodimer yapısı (iki alt birimin DD bölgeleri ayrı renklerde gösterilmiştir, sarı ve MOR); D, p50: RelA dimerinin ara yüzü; E, NF- κ B p50 homodimerinin DD ara yüzü; F, RelA homodimerinin oluşturduğu ara yüz. Huxford ve diğ. (Huxford, T., 2011)'nden alınmıştır.....	30
Şekil 2-18: NF- κ B'nin alt birimlerinin oluşturabileceği olası dimer kombinasyonları. O'Dea ve Hoffmann (O'Dea, E 2010)'dan alınmıştır.....	31
Şekil 2-19: NF- κ B p50:p65/RelA heterodimerinin κ B DNA bölgesi ile etkileşimi. Dimerlerin amino ucu DNA ile etkileşimden, karboksil ucu dimerizasyondan sorumludur. Huxford ve Ghosh (Huxford, T 2009)'tan alınmıştır.....	33
Şekil 2-20: NF- κ B1 geninin kromozom üzerindeki yeri.....	34
Şekil 2-21: Toll like Reseptörü.....	37
Şekil 2-22: TLR-4 ve TLR-2 ligandları ve fonksiyonel önemi.....	39
Şekil 2-23: TLR sinyal yolağı I (58). dsRNA, çift iplikli RNA; IKK, NF- κ B kinaz inhibitörü; LPS, lipopolisakkarite; MKK, MAP kinaz kinaz; RIP1, reseptör-ilışkili protein 1; rRNA, ribosomal RNA; ssRNA, tek-iplikli RNA; TAB, TAK1-bağlayıcı protein; TAK, TGF β -aktive kinaz; TBK1, TANK-bağlayıcı kinaz 1.....	46
Şekil 2-24: toll like reseptörlerin uyarılması.....	48
Şekil 4-1 : <i>NFKB1</i> -94 ins/del ATTG polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü (100bp marker).....	65
Şekil 4-2: TLR-2 Arg753Gln polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü.....	66
Şekil 4-3: TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü.....	67
Şekil 4-4: TLR-4 Thr399Ile polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü.....	67

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
GBM:	Glioblastoma Multiforme
RHD:	Rel-Homoloji
NF-κB:	Nükleer Faktör-kappa B
KBB:	Kan Beyin Bariyeri
SSS:	Santral Sinir Sistemi
PSS:	Periferik Sinir Sistemi
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
NT:	Nükleer Translokasyon
NLS:	Nükleer Lokalizasyon Sinyal
UV:	Ultra Viole
NO:	Nitrik Oksit
İKK:	İkB Kinaz
DD:	Dimerizasyon Bölgesi
NLS:	Nükleer Lokalizasyon Dizisi
TAD:	Transkripsiyonal Aktivasyon Bölgesi
GRR:	Glisin Amino Asidi Bakımından Zengin
LZ:	Lösün Fermuarı
IL:	İnterlökin
TLR:	Toll Benzeri Reseptör
LRR:	Lösinden Zengin Tekrarlar
TIR:	Toll/IL-1 Reseptör
PAMP:	Patojenle İlişkili Moleküler Patternler
PBL:	Periferik Kan Lökositlerinde
TNF- α :	Tümör Nekrozis Faktör- α
GPI:	Glikozilfosfatidilinozitol
MMTV:	Mouse Mammary Tumor Virus
SP-A:	Surfaktan Protein A
MYD88:	Myeloid Differentiation Primary-Response Protein

TRIF: TIR Domain-Containing Adaptor Protein İnducing IFN β

TRAM: TRIF-Related Adaptor Molekülü

IRAK: IL-1R-Associated Kinases

TRAF: TNF receptor-associated factors

JNK: JUN N-terminal kinase

IRF: İnterferon-Regulatory Factors

CREB: Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein

NLR: NOD-Like Receptor

LPS: Lipoprolisakkarit

dNTP: deoksiribonükleozid trifosfat

TBE: Tris, Borik asit ve EDTA

CRP: C Reaktif Protein

ÖZET

Kına İ. (2016). NF-kB -94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile ve TLR-2 Arg753Gln Varyasyonları ile Glioma arasındaki İlişkinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Gliomalar, merkezi sinir sisteminde (MSS) bulunan glial hücrelerden gelişen ve tüm MSS tümörlerinin % 40'dan fazlasında tanımlanan en yaygın primer beyin tümörleridir. Hücre içi sinyal yollarının kanser biyolojisinde kritik rol oynadığı iyi bilinmektedir. NFKB ve TLR sinyal yolları aktivasyonunun kanser riskindeki önemi ortaya konmasına rağmen, bu genlerdeki polimorfizmler ile glioma arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

Bu çalışmada NF-kB-94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile ve TLR-2 Arg753Gln gen polimorfizmleri ile glioma riski arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Çalışma, 120 glioma hastası ve 225 sağlıklı kontrol grubu ile gerçekleştirildi. Genotip dağılımları polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile saptandı.

Glioma ve kontrol grubundaki NF-kB-94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile ve TLR-2 Arg753Gln polimorfizmlerine ait genotip dağılımları karşılaştırdığımızda, NF-kB -94 ins/ins genotipinin glioma için risk faktörü olduğunu gösterdik ($p=0,003$). Diğer yandan, TLR-2 753 GG genotipinin glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynadığını saptadık ($p=0,001$). Ayrıca, TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi için A allelinin glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynadığını saptadık ($p<0,001$). Bu bulgulara ek olarak, TLR-4 299 AG genotipi ile azalmış glioma riski arasında anlamlı bir ilişki saptadık ($p<0,001$). TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubu arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptamadık ($p>0,05$).

Bu bulgular NF-KB ve TLR sinyal yollarındaki polimorfizmlerin glioma riskinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: NF-KB, TLR, glioma, polimorfizm

ABSTRACT

Kına İ. (2016). Investigation of the relationship between NF-kB -94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile and TLR-2 Arg753Gln variations and glioma. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Istanbul.

Gliomas are the most common primary brain tumors that develop from glial cells in the central nervous system (CNS) and are identified in more than 40% of all CNS tumors. Cellular signaling pathways play a critical role in cancer biology. Although the activation of NFkB and TLR signaling pathways is well known for cancer risk, the association between polymorphisms in these genes and glioma has not yet been elucidated.

In this study, our aim was to study the relationship between NF-kB-94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile and TLR-2 Arg753Gln polymorphisms and glioma risk. The study was conducted with 120 glioma patients and 225 control groups. Genotype distributions were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Statistical data were analyzed by IBM SPSS 20, Chi-Square test and Combined Genotype analysis.

When we compared the genotype distributions of the polymorphisms of NF-kB-94 ins/del ATTG, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile and TLR-2 Arg753Gln in glioma and control groups, we found risk factors of NF-kB -94 ins/ins genotype for glioma ($p=0.003$). On the other hand, we found that TLR-4 299 GG genotype might be associated with a protective effect against development of glioma ($p=0.001$). Furthermore, we showed that TLR-2 753 A allele was significantly associated with the decreased risk of glioma ($p<0.001$). In addition to these findings, we observed an association between decreased risk of glioma TLR-4 299 AG genotype ($p<0.001$). However, we did not reveal any markedly association between patients and controls in terms of TLR-4 399 polymorphism ($p>0.05$).

These findings show that polymorphisms of NF-KB and TLR signal pathways can play a critical role for glioma risk.

Key words: NF-KB, TLR, glioma, polymorphism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir. Genetik faktörler ve çeşitli dış etkenlerle değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz çoğalıp büyümeleri sonucu oluşan hastalıklar grubu olarak tanımlanan kanser, Dünyada her yıl 11 milyondan fazla insanı etkilemekte ve 2030 yılına kadar bu sayının iki katına yaklaşacağı öngörülmektedir (Tuncer, 2007). Sağlık Bakanlığı verilerine göre, bu artışın %75'inin ülkemizin de içinde bulunduğu gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir (Tuncer ve diğ., 2009).

Beyin ve merkezi sinir sistemi kanserleri, ölümcül hastalıklar sıralamasında erişkinlerde üçüncü, çocuklarda ise lösemiden sonra ikinci sıradadır (Ohgaki ve Kleihues, 2005). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre, primer beyin tümörlerinin görülme oranı 100.000'lik bir popülasyonda yılda ortalama 7-13 olgudur ve bunlardan 4-5'i beyin tümörleri arasında en sık rastlanan glioma tipi glioblastoma multiforme (GBM)'dir (Brandes ve diğ., 2008). GBM, ya kendiliğinden ya da düşük dereceli tümörlerden metastazla oluşur, hızla yayılır ve genelde çok kısa bir süre içinde ölüme neden olur (Kleihues ve diğ., 1993). Histolojik tip, grade, yaş, tumor yerleşimi, radyasyon tedavisi, bazı kemoterapi protokolleri (Wrensch M 2006) ve genetik faktörler (Jin et al.) glioma riski ve sağkalım oranı ile yakından ilişkilidir.

NF- κ B hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve metastazında yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlemekten sorumludur (Richmond, A. 2002 VE Chen, F 1999). NF- κ B protein ailesinin bütün üyeleri, nükleer translokasyondan sorumlu olan korunmuş bir Rel-homoloji alanı (RHD) paylaşır. RHD, proteinlerin amino uçlarında olup yaklaşık 300 aminoasit bölgesi kapsar (Dale ve ark. 2006). NF- κ B sitokinler, radyasyon ve bazı kemoterapik ajanlarla etkileşmesi sonucunda; I κ B (NF- κ B'nin inhibitörü)'nin fosforilasyonu gerçekleşir. I κ B proteozom aracılığıyla degradasyonu gerçekleşir ve NF- κ B aktive olur. NF- κ B, Rel-ailesi proteinlerinin heterodimer bir kompleksidir. NF- κ B hücre büyümesi, hücre differansasyonu, apoptozisin regülasyonu, sitokin üretimi gibi çok sayıda gen ekspresyonunu kontrol etmektedir (Oeckinghaus A 2009).

Toll like reseptörler'in kanser, diyabet, ateroskleroz, renal hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, respiratuvar hastalıklar, santral sinir sistemi hastalıkları ve

otoimmün hastalıklar gibi geniş bir hastalık grubuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. TLR'lerin tek membranlı, katalitik olmayan bir reseptör grubudur. İnsan epidermisi çok katlı stratifiye epitelden oluşmuştur ve konak için ilk savunma bariyerini oluşturur. Vücuda girmiş olan mikroorganizmaları tanıma ve bağışıklık yanıtını oluşturmada görev alırlar. TLR'lerin immün sistemde anahtar rol üstlendikleri düşünülmektedir. İnfeksiyöz hastalıklara karşı immün sistemin şekillenmesinde ve patojenin tanınmasında da katkılar vardır. Epidermiste major hücre popülasyonunu oluşturan keratinositler fiziksel bariyer olarak rol oynadıkları gibi ilk immün yanıtın oluşmasında da görev alırlar (Kim J). Kronik inflamatuvar hastalıkların TLR sinyal yoluyla kanser gelişiminde katkısı olduğu ortaya konmuştur (Li Q,2005).

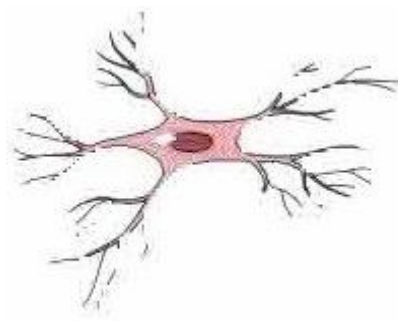
Literatürde Beyin kanserinde (Glioma) NF-kB ve TLR geni ile ilişkili olarak yapılan çalışmalar mevcut değildir. Bu tez projesinin amacı NF-kB NFKB1 -94 ins/del, TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile ve TLR-2 Arg753Gln gen polimorfizmleri ile glioma riski arasındaki ilişkiyi tanımlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 GLİAL HÜCRELER VE GLİOMALAR

2.1.1.Normal Glial Hücreler

Omurgalı yapılarında nöronlar, nöroglia hücrelerinden temel alan hususi bir destek doku içerisinde yuvalanmıştır. Nöroglia hücreleri nöronlar gibi uzantılı hücrelerdir. Nöroglia hücrelerinin yapısı nöron hücrelerine benzemekle beraber görevleri onlardan farklıdır (Şekil 2-1). Nöroglia hücreleri, sinir dokusunun tahrip olduğu bölgelerde çoğalarak, tahrip olan bölgeyi bir yama gibi kapatır. Nöroglia hücreleri nöronların beslenmesinde ve atık maddelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar. Nöronları diğer nöronlardan ayırarak, impulsların nöronlar süresince kararlı iletilmesine yardımcı olur. Ayrıca bakteri, virüs v.b. zararlı faktörlerin nöronlara ulaşmasına bariyer olurlar. Tüm Santral Sinir Sistemi (S.S.S) hücreleri embriyogenez esnasında nöral plaktan oluşur. Bu sistemde T1A ve O2A adı verilen asıl (progenitör) hücrelerin astrosit ve oligodendrositlere farklılaştığı ortaya çıkmıştır. T1A hücreleri S.S.S’de strüktürel bir rol oynar. O2A ata hücreleri ise, ayrışmanın yanında aksonal iletimde işlevsel bir rol oynayan hususileşmiş hücrelerin çoğalmasını da temin ederler (BASARAN A, 2005 VE PAUNU N, 2002).



Şekil 2-1: Bir nöroglia hücresi genel şekli (FALCHETTI A, 1999)

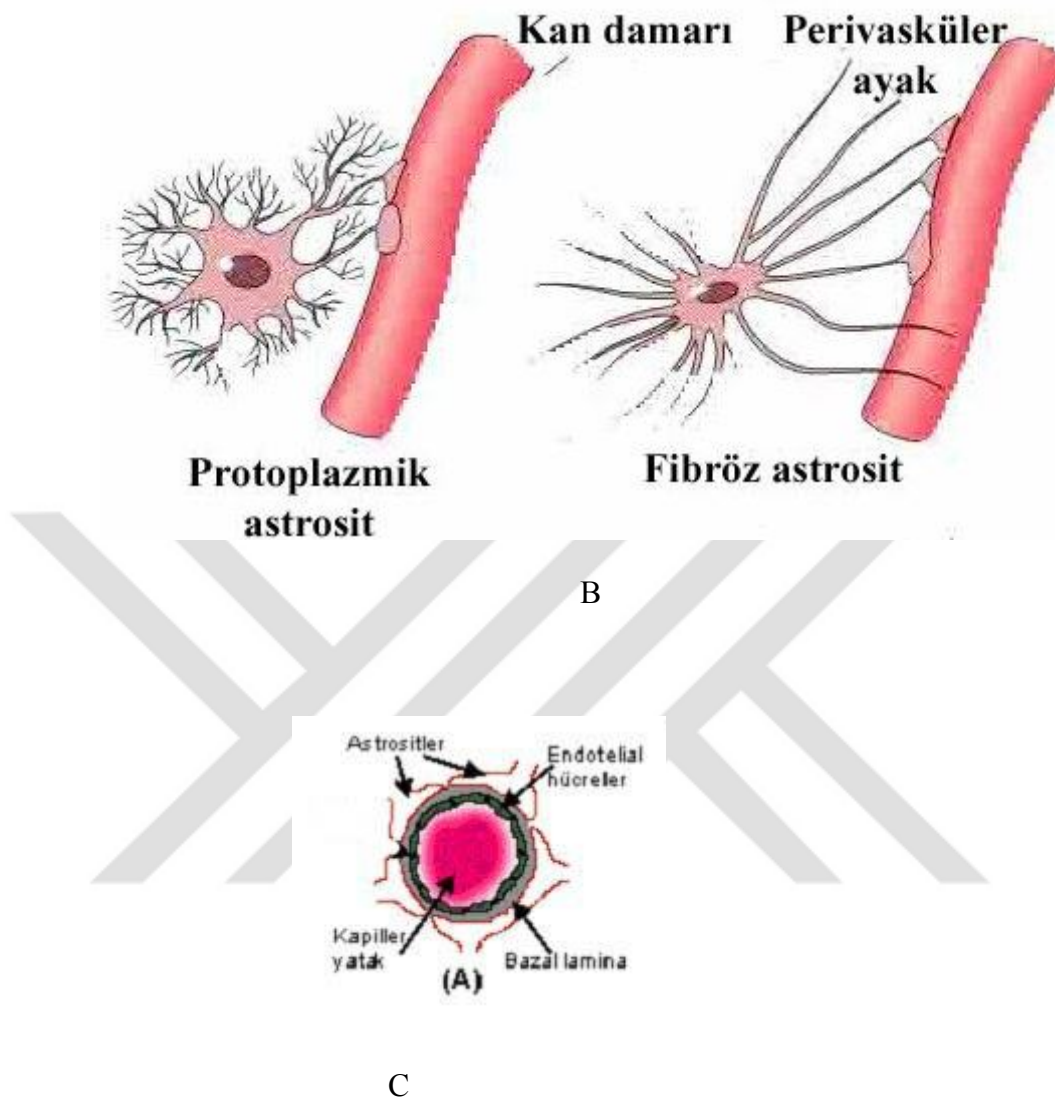
Nöroglial hücreler 3 grupta incelenir: Astrositler, Oligodendrositler ve Ependimal hücreler

2.1.2.Astrositler

Astrositler çok sayıda dalı olan hücrelerdir. Kan beyin bariyerinin ortaya çıkmasını ve sürekliliğini temin edecek biçimde kapillerlerin çevresindeki endotelial hücrelerle temas kurarlar (Şekil 2-2 :A, B ve C; Şekil 2-3). Nöron ve onun dalı olan aksona biyokimyasal ve fiziksel dayanak yanında, nöron alıcı sathının izolasyonunu sağlarlar. Kan beyin bariyeri (KBB), beyin dokusunun beslenmesi için kanın kimyasal yapılarının girizgahını denetleyen karmaşık bir yöntemdir. Bu sistem kapiller mecra ile parankimal doku (sık hücreli bağ doku) arasındadır. Bu engele bazen ekstrasellüler-kan engeli(bariyeri) adı da verilmektedir. KBB’de endotelial hücreler ve bunların bazal zarlarını astrositler kuşatır. Endotelial hücreler, birbirlerine iyice tutkun olup, kimi iyon ve metabolitlerin intikalinde tesirlidir. Bu muntıkalar, güçlü moleküler graviteli bileşiklerin intikaline mani teşkil eder. Olağan hallerde, su, bazen iyon ve yağda çözünebilen yapıların geçişini sağlarken, globülin, albumin ve nörotransmitterlerin geçişine engel oluştururlar. Enzim sistemleri iyon ve metabolitlerin geçişini düzenler.(COSAN E, 2004 ve PAUNU N, 2002 ve 5).

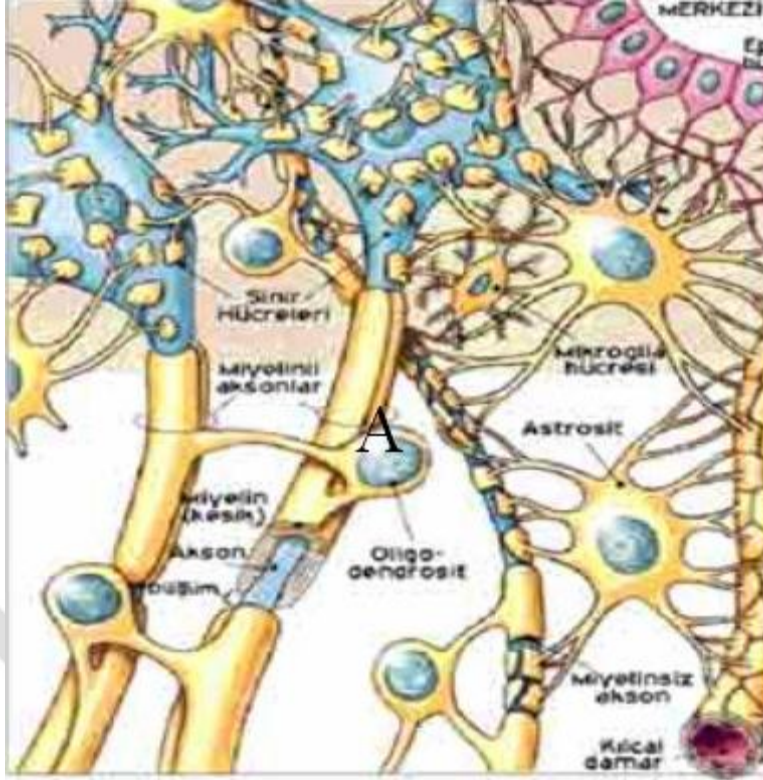


A



Şekil 2-2 :A) Fibröz astrositlerin ısıık mikroskobundaki görüntüsü (FALCHETTI A,1999) B)Astrositlerin sematik şekilleri (FALCHETTI A,1999) C) Kan-Beyin Bariyerinde astrositler (COSAN E, 2004).

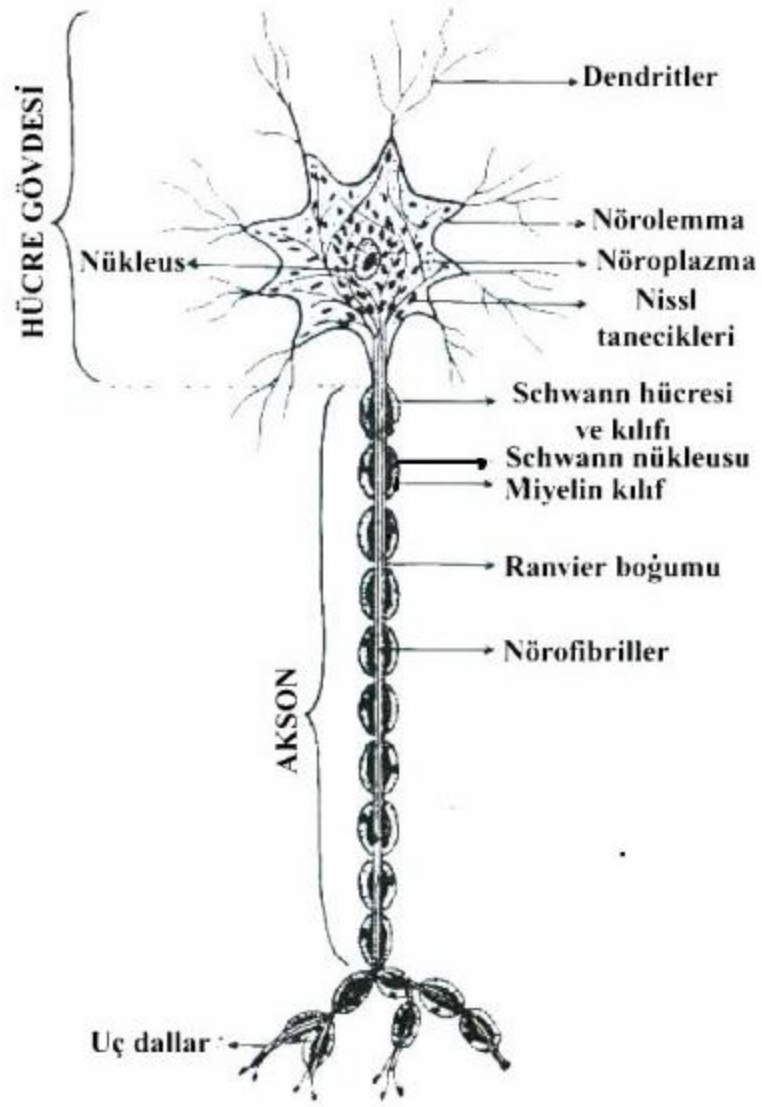
Astrositler; hasara uğramış beyin dokusunda, gliosis adı verilen nedbe (skar) dokusunu oluştururlar.Bu oluşumundan dolayı fibrositlere benzemektedirler (FALCHETTI A,1999).



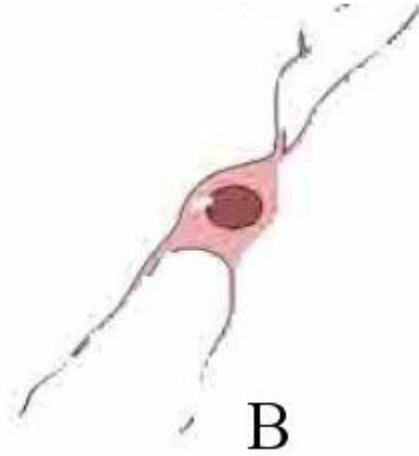
Şekil 2-3: Nöroglia hücrelerinin beyinde yerleşimi

2.1.3.Oligodendrositler

Miyelin kılıf periferik sinirlerde Schwann hücreleri tarafından, SSS'de ise, oligodendrositler tarafından meydana getirilir. S.S.S'de bulunan miyelinin yerini tutarlar. Onları bu görevleri ile Periferik Sinir Sistemindeki (PSS) Schwann hücreleri gibi düşünebiliriz (Şekil 2-4 : A ve B) (BASARAN A., 2005 ve PAUNU N, 2002 ve 5).



A



Şekil 2-4: A) Oligodentrositin sematik çizimi (GARTNER L.P, 1997),

B) Nöron hücresi (BASARAN A., 2005)

2.2.Ependimal hücreler

Serebral ventriküller ve spinal kordun santral kanalının içini tek katlı olarak döseyen kübik sekilli hücrelerdir . Beyin ventriküllerinin sınırlarında ve spinal kordun santral kanalında bulunurlar. Ventriküler ependimada ve KBB’de düzenli bir sıvı alışı verisi olur. Beyindeki ependim döseli kavitelelerin kimi kollarında beyin omurilik sıvısı (BOS) üretilir. İşte bu bölgelerdeki ependimal hücreler ile kapiller yapıların bir araya geldiği yapıya koroid pleksus adı verilir (PAUNU N, 2002).

2.3.Gliomalar

Gliomalar, S.S.S’de bulunan glial hücrelerden köken alan tümörlerdir. Gliomalar, tüm S.S.S tümörlerinin % 40’ından fazlasında görülen en çok bulunan primer beyin tümörleridir (CHINTALA S.K, 1996).

Büyük oranda beyin dokusunun içine sızarak beyni çepe çevre sararlar. Glioma hastalarının tümörlü dokusunun tamamı cerrahi operasyonla kesilip çıkarılması çoğu zaman mümkün değildir.bundan dolayı cerrahi operasyondan arta kalan tümör hızla büyür ve hastalık tekrardan nükseder.Cerrahi operasyondan sonra hastalığın tekrar nüksetmesi tedaviye rağmen hastanın yaşam süresini ortalama 8-12 ayadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda in vitro ve in vivogliomaların invazif davranışları anlaşılabilmesine karşın, yaygın infiltrasyona neden olan etkenler günümüzde tam manasıyla ortaya konamamıştır.(CHINTALA S.K, 1996).

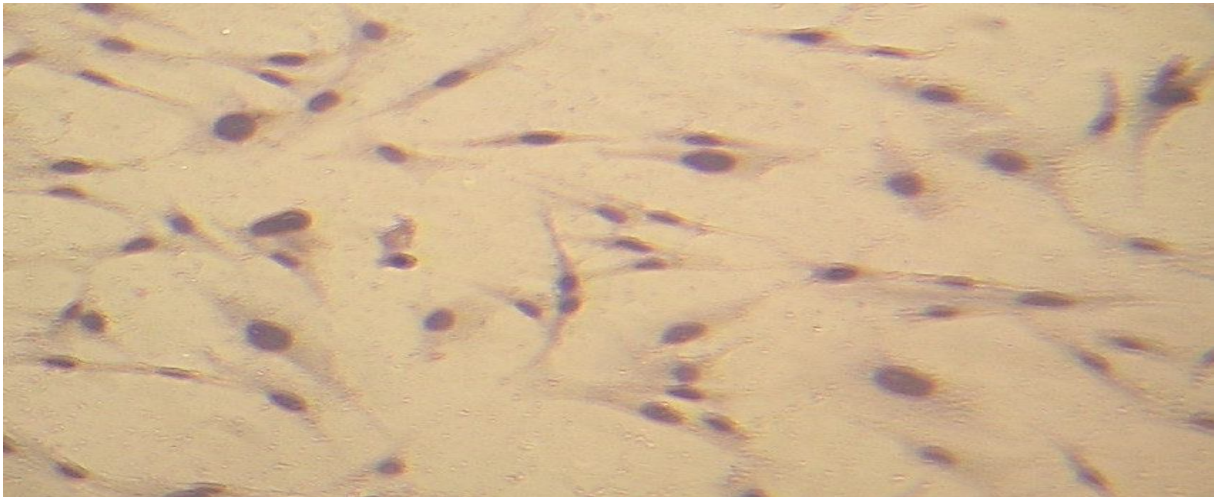
Gliyal hücrelerin farklı tipleri, S.S.S.'deki yeri, yaşı, gelişim potansiyeli, invazivitenin yaygınlığı, morfolojik özellikler, hızlı ilerleme eğilimi ve klinik tabloya göre, farklılıklar gösterir (PAUNU N., 2002).

Gliomalar saldırgan tümörler olup, yüksek üreme etkinliği gösterir. Kanserin ,Grade'si arttıkça telomeraz etkinliği de artmaktadır. Kanserdeki bu artış'ın sebepleri, çoklu genetik varyasyon ve mutasyonlara bağlıdır (CHINTALA S.K, 1996 ve COLLINS V.P,1999 ve MORII K, 1197). Gliomalarda; tümör baskılayıcı genlerde (p53, RB, Ras, p16, PTEN/MMAC), siklin bağımlı kinazlarda (CDK4, CDK6), büyüme faktörü reseptörlerinde (EGFR, PDGFR) hatalar olduğu ve başkaca bazı kromozomal anomalilerine rastlandığı bildirilmiştir (COLLINS V.P,1999). Gliomaların teşekkülünde en mühim faktör olarak , p53 ve RB genlerindeki hatalar gösterilmiş olup, telomeraz etkinliğinin artısında da başta bu genlerdeki mutasyonların tesirli olduğu gösterilmiştir(COLLINS V.P., 1999).

Gliyal hücrelerden oluşan tümörler kendi aralarında astrositomalar, oligodendromalar ve ependimomalar olmak üzere üçe ayrılır:

2.3.1.Astrositomalar

Gliomaların astrositlerden köken alan tümör çeşidine astrositoma denir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Kültürde astrositoma hücreleri.

Astrositomalar, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization(WHO-DSÖ),’na göre kısaca aşağıdaki gibi sınıflanmıştır;

Grade I: Piloitik astrositoma, bu Piloitik astrositomalara dev hücreli astrositoma da denir ve en yaygın olarak çocuklarda görülen tümörlerdir. Astrositlerin olduğu her yerde olabilmesine rağmen özellikle optik sinirler, 3. ventrikül, talamus, medial temporal lob, beyin sapı (pons) ve serebellum gibi, tipik olarak orta çizgi yapılarında lokalizedir. Piloitik astrositomlar seyrek olarak komşu dokulara yayılmışlardır. Bu tümörler, sıklıkla yavaş gelişirler ve malign transformasyon nadirdir (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002).

Grade II: Düşük grade astrositoma grubuna fibriler ve protoplazmik astrositomalar girmektedir. Bu tümörler tipik olarak gençlerde olur. Düşük grade astrositoma, beyin parankimasını çevreleyerek yayılcılık gösterirler. Astrosit hücrelerinin olduğu her yerde gelişebilmesine rağmen hususiyle serebral hemisferde lokalize olmaya yatkındırlar (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002).

Grade III: Anaplastik astrositoma, her yasta görülebilir. Anaplastik astrositoma (WHO grade III) tümör yapısındaki fibröz ya da gemistocytic astrositler ile karakterizedir. Astrosit hücrelerinin bulunduğu her yerde olabilirler (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002).

Grade IV: Glioblastoma multiforme, 55 yaşın üzerinde sık görülür ve tüm primer beyin tümörlerin % 40’ını ihtiva etmektedir. Malign (kötü huylu tümör) astrositoma olarak da bilinmektedir. Astrositlerin bulunduğu tüm yerlerde bulunabilmesine rağmen, hususiyle nöral dokularda çokca bulunur. Glioblastoma multiforme sıklıkla nükseder ve çoğunlukla yetişkinlerde etkisini gösteren kötü huylu beyin tümörleridir.Glioblastomanın en çok görülen yerleşik bölgeleri frontotemporal bölgededir, ama çeper loblar da çoğunlukla etkilenir. Glioblastomalar genellikle yan hücrelerin yarım kürelerinin içinde yaygınlaşarak kospus kallosum süresince infratedir (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002 ve KORNGUTH S.E., 1989).

2.3.2. Oligodendrogliomalar

Oligodendrogliomalar'ın kanser yapısı oligodendrositlerden teşekkül eder ve yaygın gelisen kanserlerdir. Glioblastomaya doğru kötü huylu tümörlerin(maling) ilerleyişi olur, ama bu maling tümörler geniş çaplı yayılan astrositomalara göre daha azdır (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002).

2.3.3.. Ependimomalar

Ependimal hücrelerden köken alan ependimomalar çoğunlukla yavaş gelişim gösterirler. Ependimomanın gelişmesi kısmen tümör dokusunun yerleşmesine ve anaplazinin var olup olmamasına göre değişim gösterir (CHINTALA S.K.,1996 ve COSAN E. 2004 ve PAUNU N, 2002).

2.4. Glial Tümörler ve Moleküler Düzensizlikler

Beyin tümörlerinin %60'ını nöron destek dokularından köken alırlar. Nöron destek dokularından köken alan gliomalar fenotipik olarak Oligodendroglioma, Astrositoma ve Oligoastrositoma şeklinde üç ana gruba ayrılmaktadır. DSÖ'nün 2000'de geliştirmiş olduğu sınıflandırma ile Gliomalar dört ana derece(grade) grubu oluşturacak şekilde, anaplastik değişiklikler olan mitoz, nekroz, çekirdek atipisi, mikrodamar çoğalması değerlendirilerek sınıflandırılır (Şekil 2-6)(Behin A., 2003 ve Felsberg J., 2002 ve Kleihues P., 2000).

Tablo 2-6: GLİOMALARIN WHO DERECE (GRADE) SINIFLANDIRMASI
ASTROSİTOMALAR

- Pilositik WHO DERECE I
- Astrositom WHO DERECE II
- Anaplastik WHO DERECE III
- Glioblastoma Multiform WHO DERECE IV

OLİGODENDROGLİOMALAR

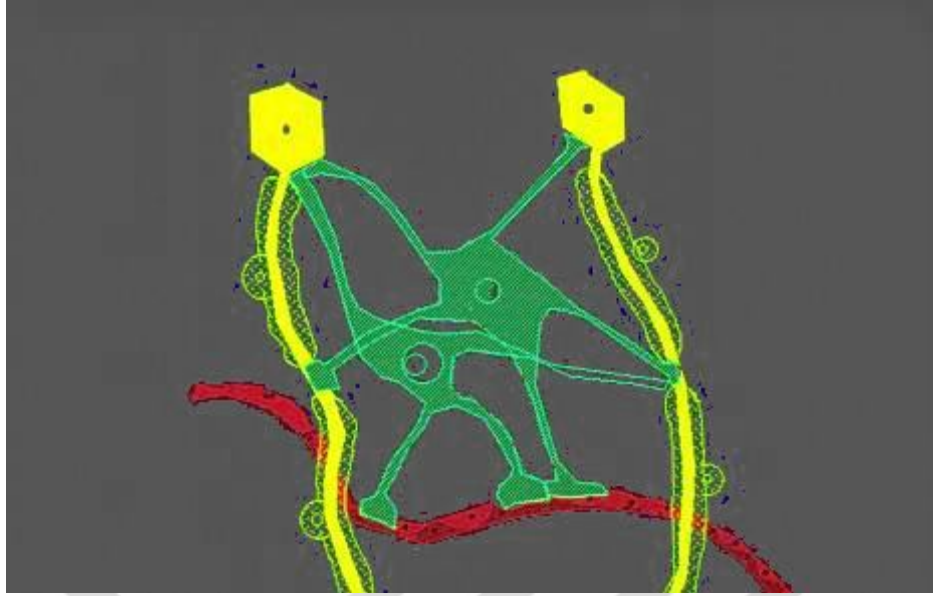
- Oligodendroglioma WHO DERECE II
- Anaplastik Oligodendroglioma WHO DERECE III
- Glioblastoma Multiform WHO DERECE IV

• EPENDİMOMALAR

- Subependimoma WHO DERECE I
- Ependimoma WHO DERECE II
- Anaplastik Ependimoma WHO DERECE III

Astrositomalar içerdikleri hücrelerin morfolojilerine göre 3 alt gruba ayrılırlar (Behin A., 2003):

1. Fibriler Astrositoma yaygın sitoplazması ve ince uzantıları bulunan hücrelerin oluşturduğu fibrilden zengin tümör stroması ile tanımlanır.
2. Protoplazmik Astrositoma mikrokistik veya mukoid (sümüksü) matriks içine gömülmüş seyrek uzantıları bulunan küçük eozinofilik sitoplazmalı neoplastik astrositlerden oluşur.
3. Gemistositik Astrositomada tanı, tümör bütünü içinde bulunan gemistositik neoplastik astrositlerin tüm hücrelerinin %20'si ve üzerinde bulunması ile yapılabilir(Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Astrositler (yeşil renkli hücreler) ve Oligodendrositler (aksonların çevrelerinde yerleşen sarı taralı alanla gösterilen hücreler)

Derece I, çocuk yaşlarda saptanabilen, prognozu iyi olan pilositik astrositoma namına adlandırılan safhayı meydana getirir. Derece II, 20'li 30'lu yaşlarda tespit edilen, hafif yol alarak Derece III ve IV'e dönüşebilen safhadır (Collins V. P., 2002). Derece III anaplastik varyasyonların uygun görüldüğü ve çabucak derece IV'e intikal eden tümörlerdir (Cavaliere R., 2005). Derece IV, gliomalarda yolun sonu olarak değerlendirilir. Sağkalım 1-2 ay ile sınırlıdır. Glioblastoma Multiform (GBM) olarak da isimlendirilir. GBM'ler iki farklı yolla oluşurlar: Primer GBM (de novo); 50 yaşının üzerindeki hastalarda görülür . Sekonder GBM ise düşük dereceli gliomaların dönem zarfında varyasyonlara yaklaşması ile vuku bulan TP53 mutasyonlarından menşeyini alır ve büyük oranda genç gurube etki eder.(Behin A.,2003 ve Merlo A., 2003). Gliomaların cerrahi operasyonla kanserli dokunun bütün olarak çıkarılması, normal beyin dokusunun içerisine sıkı bir şekilde nüfus ettiğinden dolayı zordur. Ayrıca diğer beyin kanserlerinin cerrahi yöntemlerle alınmasında kanserli dokuyla beraber kansersiz dokunun olabildiğince alınmaması , hastanın yaşam süresi ve kalitesini belirlemede etkin rol oynar. Bundan dolayı kanserli doku alındıktan sonra görüntüleme yöntemleriyle normal dokuda kanser kalıntısı kitlesini saptamak genel bir uygulamadır. Bu hal rekürrens ve prognozda tesirli olduğu tespit edilmiştir (Herfarth K.K., 2001 ve Johannesen T.B., 2003 ve Watanabe T.,2003).

Johannesen ve arkadaşlarının yaptıkları popülasyon kaynaklı çalışmalarda, 1970-1981 ile 1981-1993 dönemler karşılaştırıldığında, 15-49 yaş bandındaki genç, nöro-epitelial tümörlü yetişkinlerin sağkalım zamanlarının daha uzun olduğu (%16.5 ve %33.1) ortaya konmuştur. Bu değişikliğin sebebi amelyat sonrasında normal dokularla beraber kalan kanserli kalıntı kitlesinin görüntüleme teknikleriyle daha net tespit edilmesi ve kanser preparasyonunun daha düzgün yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır. (Johannesen T.B., 2003). Kanser histolojik olarak 'iyi' açıklanabilmesi ile sağkalımda elde edilen başarı, moleküler karakterinin tayin edilmesiyle de tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar ortaya çıkacaktır (Johannesen T.B., 2003). Yukarıdaki değişkenler dışında ilintilendirilebilecek biyolojik ögeler araştırıldığında bu kanserlerin %60'ında TP53 mutasyonların görüldüğü ayrıca %70-80'inde ise p53'e bağlanarak yıkımına neden olan mdm-2'nin artmasından dolayı fonksiyon kaybı teşekkülü görülmüştür. İlk yapılan yayın çalışmalarında TP53 mutasyonlarının glioma hastalarında sağkalım süresinde tesiri mevzuunda ihtilafli sonuçlara ulaşıldı. Ancak ilerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda kanserin heterojenik olmasından dolayı bu itilafın sebebi anlaşılmıştır. (Peraud A., 2002). Astrositomalarda fenotip bakımından eliptik hücrelerin bir araya gelerek gemistositikleri oluştururlar. Astrositoma grubu içerisinde gemistositikler sağkalım süresi diğer guruplara göre daha kasadır. Gemistositik astrositomalarda TP53 mutasyonları siktir. Bu kötü prognozlu astrositoma alt grubunda TP53 mutasyonlarının kötü prognozu belirttiği belirlenmiştir (Peraud A., 2002). Oligodendrogliomalarda 1p, 19q delesyonu, astrositomalarda ise TP53 mutasyonu çok fazla görülen moleküler intizamsızlıklardır. Tablo 2-1 de sırasıyla oligodendroglioma ve astrositomadaki moleküler intizamsızlıkları görülmektedir.

	Düşük Dereceli Astrositoma	→	Anaplastik Astrositoma	→	Glioblastoma
Sağkalım	2-10 yıl		2-3 yıl		9-12 ay
Proliferasyon	+/-		++		+++
İnvazyon	++		++		+++
Anjiogenez	-		-		+++
Nekroz	-		-		+++
Tedaviye Cevap	-		++		-

p53 mutasyonları PDGF/R anlatım artışı	RB mutasyonu CDK4 amplifikasyonu INK4a/ARF kaybı PTEN kaybı DMBT1 kaybı 19q kaybı 11p kaybı	EGFR amplifikasyonu EGFR mutasyonu INK4a/ARF kaybı PTEN kaybı RB mutasyonu PTEN mutasyonu
---	--	--

Tablo 2-1: Astrositomaların derecelere göre taşıdıkları moleküler özellikler

2.5. Gliomagenez

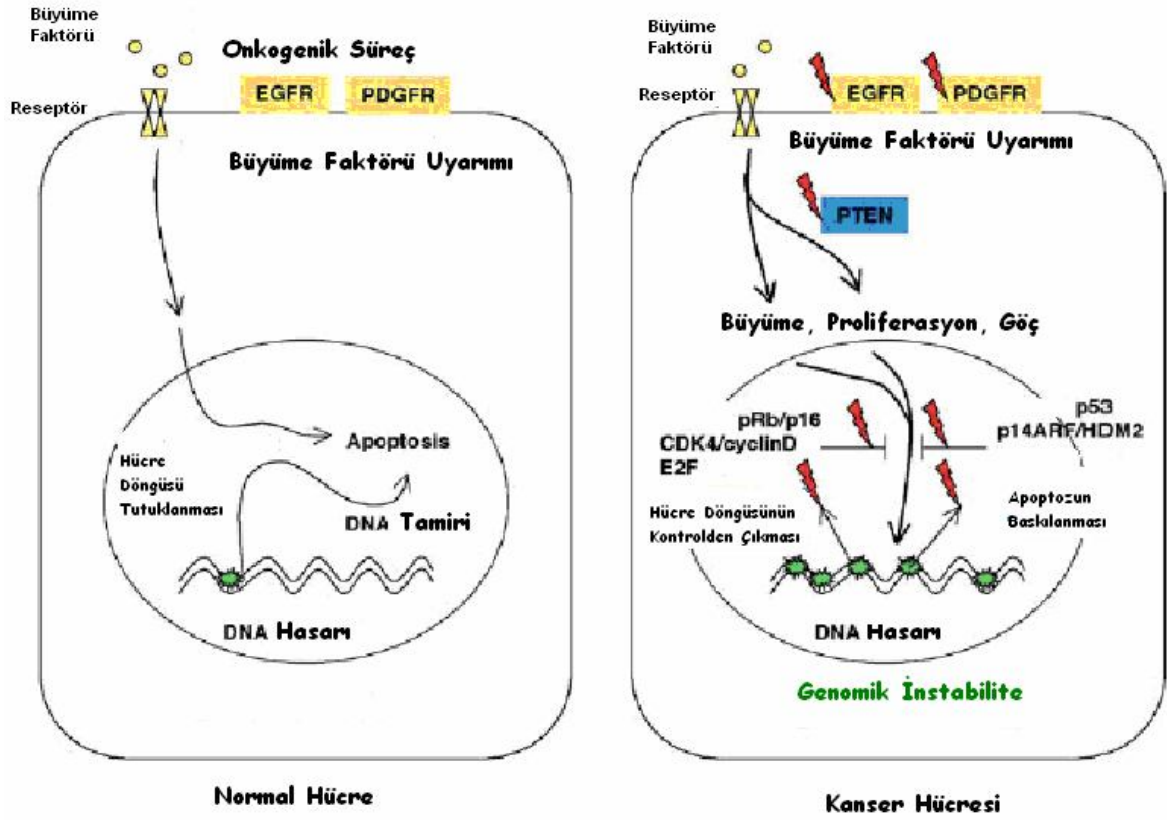
Dışardan yada içeriden onkogenik bir uyararla uyarıldığında normal hücrenin hücre döngüsünde duraklamalar ve DNA hasarı-tamiri, tamiri mümkün değilse Apoptosis(programlı hücre ölümü) mekanizmalarını çalıştırırken, genomdaki bu düzensizliğe karşı hücre yaşamına devam eder. Şekil 2-7 deki moleküler nizamsızlık, gliomaların köken aldıkları nöroglial hücrelerde genomik düzensizlik ortaya çıkmasında rol oynayan gerçek nizamsızlıklardır.

Nöroglial hücreler astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücrelerden oluşurlar. Bu hücreler sinir hücrelerinin saklaması ve devamlılığı için önemlidir. Tüm M.S.S hücreleri embriyonun teşekkülü sırasında nöroektodermden veya nöral plaktan gelişir. İki öncü hücre sırasından T1A ve O2A değişerek astrositler ve oligodendrositleri meydana getirmektedir ve T1A'nın S.S.'de strüktürel manada rol oynadığı ve O2A'nın aksonal iletimde fonksiyonel misyonu olan hususileşmiş hücreleri meydana getirdiği öngörülmektedir (Paunu N., 2002).

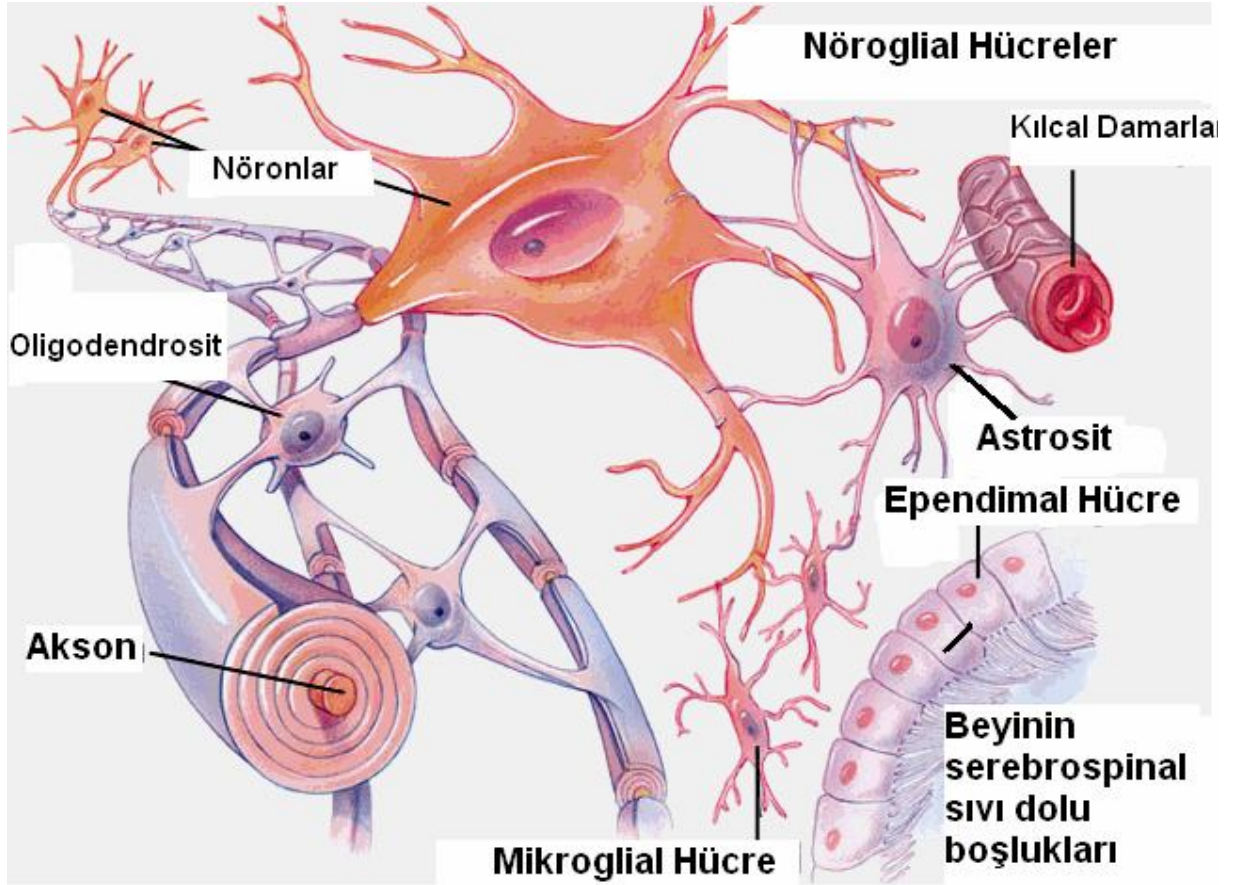
Astrositlerin sinir hücrelerine fiziksel ve biyokimyasal dayanak oluşturmaları, nöronların kontrolsüz madde alımında nöron yüzeyinin izole ve kılcıl damar endotel hücreleriyle kan-beyin engelinin teşekkülünde vazifelidirler. Bununla beraber hasar görmüş beyin dokusu gliosis denilen "iz" dokusunu meydana getirirler. Bu hücreler nöron hücrelerinin göç etmelerinde, sinaptik geçişlerin kontrol edilmesinde, sinaps sayısının denetlenmesinde ve nöronların enerji ihtiyacının giderilmesinde rol oynar.

Oligodendrositler M.S.S'deki miyelinin üretilmesi ve sürekliliğinin sağlanması ve P.S.S Schwann hücrelerinin benzeridir. Serebral ventriküllerin dış yüzeyini kaplayan hücreler, ependimal hücrelerinin tek katlı hücre tabakasından oluşur. Düzenli sıvı alış-verişi kan-beyin engeline ventriküler ependimada vuku bulur (Paunu N., 2002).

Glia hücreler ve yerleşmelerini gösteren Şekil 2-8'de sinir hücreleri aksonlarını her yandan çevreleyen oligodendrositler, dalları ile damarları sararak nöronlar ve kan damarları aralarında köprü meydana getiren astrositler ve ventriküler kesintilerin yaygısını meydana getiren sıvı varyasyonlarında aktif bulunan ependimal hücreler görülmektedir.

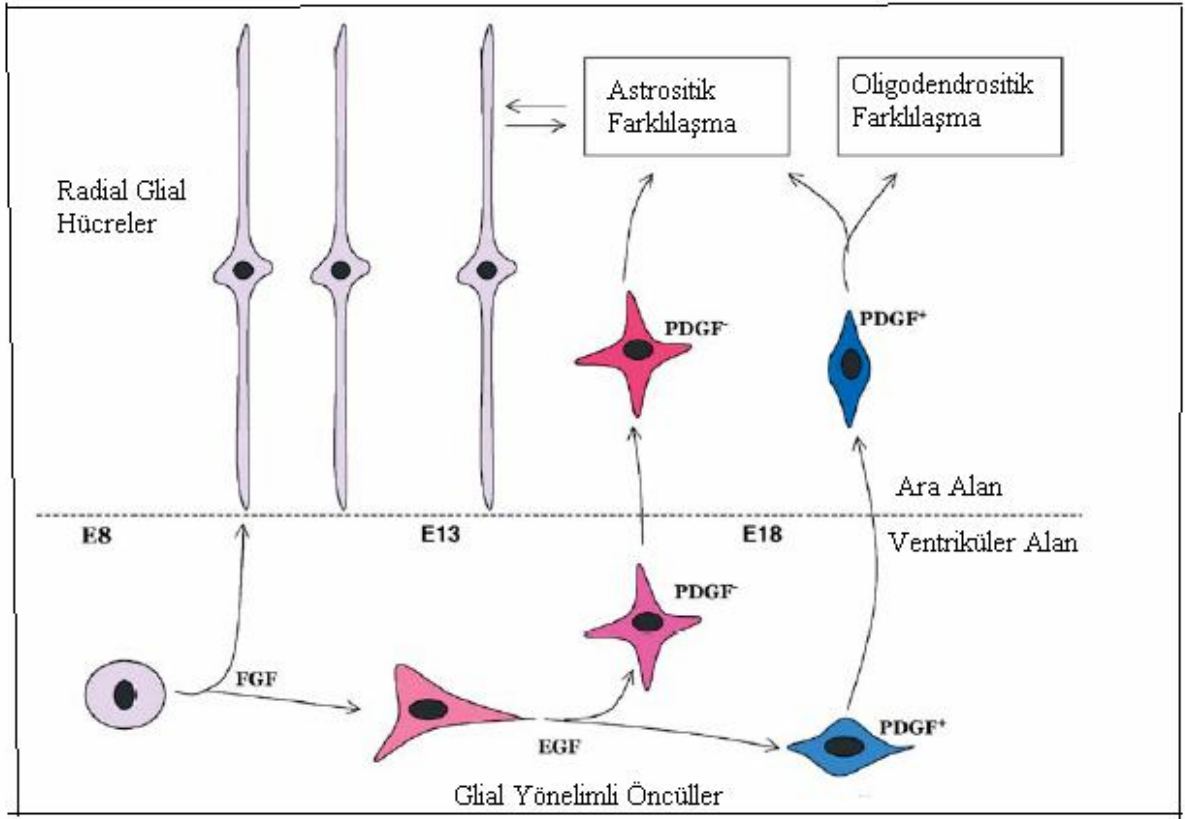


Şekil 2-7: Normal hücre ve kanser hücresinin onkogenik strese verdikleri cevaplar. Dış veya iç kaynaklı stres durumunda normal hücre, DNA tamiri ve programlı hücre ölümü mekanizmalarını aktif duruma getirirken, kanser hücresi hücre döngüsü durdurulması ve apoptoz gerçekleştirilemediğinden genomik kararsızlığına rağmen yaşamına devam eder (Merlo A., 2003).

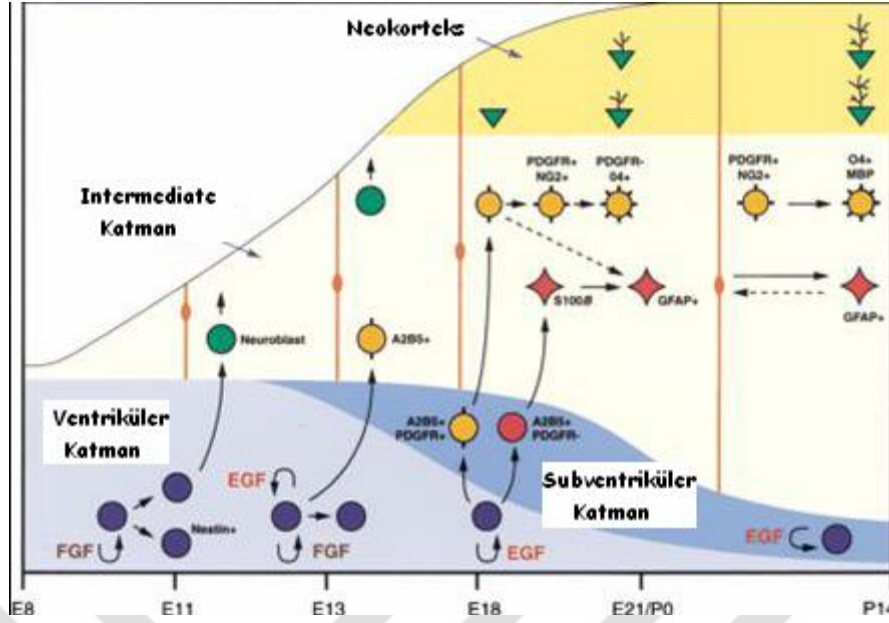


Şekil 2-8: Glial destek dokusunu oluşturan hücre tipleri ve yerleşimleri .

Embriyonik döngünün sekizinci gününde ventriküler alandaki kök hücreler Fibroblast Büyüme Faktörüne(FGF)cevaplandırılarak kalan ara bölgede radial glial hüceleri meydana getirirler.Nöronal ve glial hücrelerin öncülerinin oluşması radial glial hücrelerin ventriküler alandan göç etmeleriyle meydana gelirler. Glia yönelimli hücrelerin oluşmasında, embriyonik sürecin onüçüncü gününde puliripotent kök hücreler ,Epidermal Büyüme Faktörü'ne (EGF) duyarlı hale gelerek öncüleri meydana getirirler. Embriyonik sürecin onsekizinci günde hücreler yalnız EGF'ye duyarlıdır bununla beraber glia yönelimleri PDGF R+ ve PDGFR- öncülerini meydana getirirler (Şekil 2-9 , Şekil 2-10). Oluşan hücreler de ventriküler sahadan aralıklı sahaya taşınarak oligodendrogial veya astrositik ayrışma prosesine oluştururlar. Farklılaşma süreci içerisinde Oligodendrositlerin öncülleri astrositleri ve astrositlerin öncülerini tekrar değişerek radial glial hüceleri meydana getiriler. Çevre uyarılarının etkisiyle radial glial hücelerin asrositlereve astrositlerin de radial glial hücelerine dönüşürler. (Merlo A., 2003).



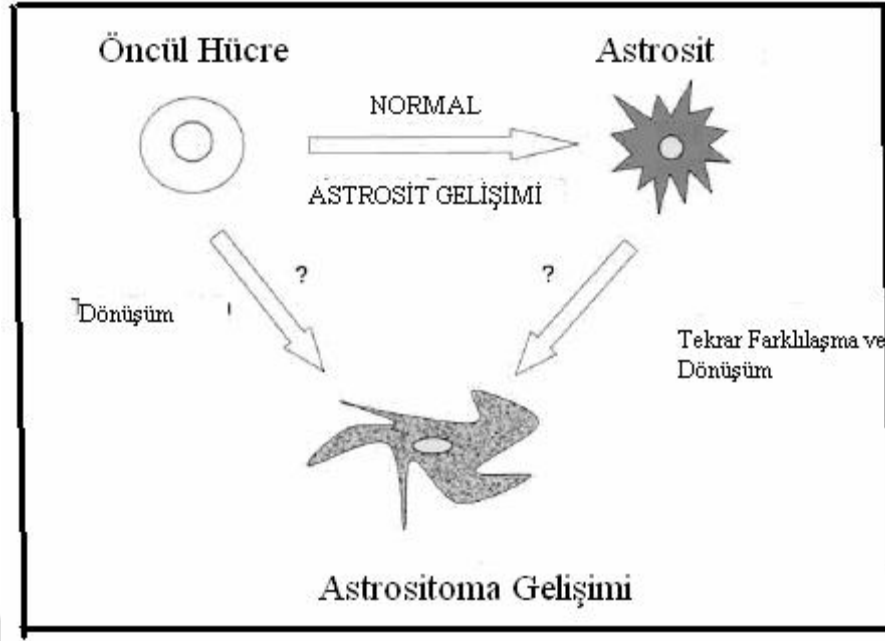
Şekil 2-9: Glial Hücrelerin Embriyonik Gelişimi. Şekilde glial tanımlanmış öncüllerin büyüme faktörleri etkisiyle embriyonik günler 8, 13, 18' de değişimleri görülmektedir (Merlo A., 2003).



Şekil 2-10 : Embriyonik gelişim sırasında kök hücreler, büyüme faktörleri etkisi altında ventriküler katmandan subventriküler, intermediate katmana ve neokortekse göç edişleri sırasında farklılaşarak nöronları (yeşil), oligodendrositleri (sarı) ve astrositleri (kırmızı) oluştururlar (Andrea J.,2001 ve) Ding H.,2000).

Astrositomalar ve oligodendrositomaların büyüme dönemlerinde köken oluşturan hücre çeşitleri iki ayrı hipotezi bulunmaktadır. Birinci hipotez; kanser hücrelerinin direkt öncül hücrelerden geliştiği, ikinci hipotez ;gelişim dönemini tamamlamış olan olgun astrositten tekrardan farklılaşarak meydana gelmiştir. Bu hipotezlerin doğruluğu henüz kanıtlanamamıştır (Şekil 2-11). Deneysel olarak olgunlaşmış astrositlerin embriyoya ekiminden sonra sadece ekim bölgesindeki hücreleri değil ekim bölgesindeki farklı bölgelerde de radial glial hücrelere yeniden değiştikleri görülmüştür. (Konopka G.,2003, Merlo A., 2003). Holland ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada nöronal öncül hücrelerden glioma hücrelerine dönüşüm gösterilmiştir (Konopka G.,2003).

Depinho ve arkadaşları eş varyasyonların erişkin olan astrositler için de muteberliği ortaya konmuştur. Glioma hücrelerine dönüşebilen nöronal kök hücre olan nestin+ ve astrositoma olan GFAP+ hücreleri olduğu görülmüştür. (Konopka G.,2003).



Şekil 2-11: Astrositomaların gelişimi hipotezleri (Konopka G.,2003).

2.6 Nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ailesi

Nükleer faktör- kappa B (NF-κB) ilk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore birlikte keşfedildi. NF-κB bir transkripsiyon etkenidir (Baldwin 2001). NF-κB ilk olarak sıçanların B lenfositlere has olan immunoglobulin K kolay zinciri(light chain)genin ekspresyonunu tanzim etmek için ortaya çıkan bir protein olarak tanımlanmıştır.İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda NF-κB'nin B ve T lenfositler, fibroblast ve monositik makrofajlar gibi türlü hücre çeşitleri sentezlenen mühim bir regülatör protein olduğu ortaya çıkmıştır. (Baeuerle 1998, Baeuerle ve Henkel 1994, Blank ve ark. 1992).

Memeli hücrelerinde NF-κB transkripsiyon faktörü ailesi; yapıları, fonksiyonları, sentezlenme şekli ve C terminal sırasına bakılırsa değişiklik gösteren 2 protein grubu başlığı altında incelenir (Lawrence ve ark. 2001).

Birinci grup;uzunlamasına polipeptidler biçiminde sentezlenen bu polipeptidlerin proteoliz muamelesi ile p50 ve p52 küçük etkili moleküller oluşur. Oluşan bu moleküllerden sırasıyla p105 ve p100 oluşur. P50 aslında p105den meydana gelirken, p100'un proteolizi NF-κB indukleyen kinaz (NF-κB inducing kinase, NIK) aracılığıyla indüklenebilir. Ayrıca fosforilasyon ve poliubikitinasyon prosedürü ile tanzim edilir. p105 ve p100 klavuz proteinleri

C- terminali IκB proteinlerine mahsus bulunan çok klonlu ankirin tekrarlar bulundurulur. Bu yinelenmiş proteinleri inhibe eder. Bu klas proteinler proteolizis yada translasyon esnasında aktif hale geçirilirler (Gilmore 1991; Blank ve ark. 1992; Baeuerle ve Henkel 1994).

İkinci grup; NF-κB protein grubunda; p65 (RelA), c-Rel (homologu retroviral v-Rel) ve RelB'den teşekkül eder. Oluşan proteinler prekürsörlerden kaynak almazlar bunlar C-terminal transkripsiyonel aktivasyon domaininde yer alırlar. Rel proteinleri C-terminalinde aktifleştirici domain bulundurulur. Bu domainin serisi korunmamıştır (Kurylowicz ve ark. 2007).

Özetle, NF-κB ailesinin azası olan beş protein tespit edilmiştir :

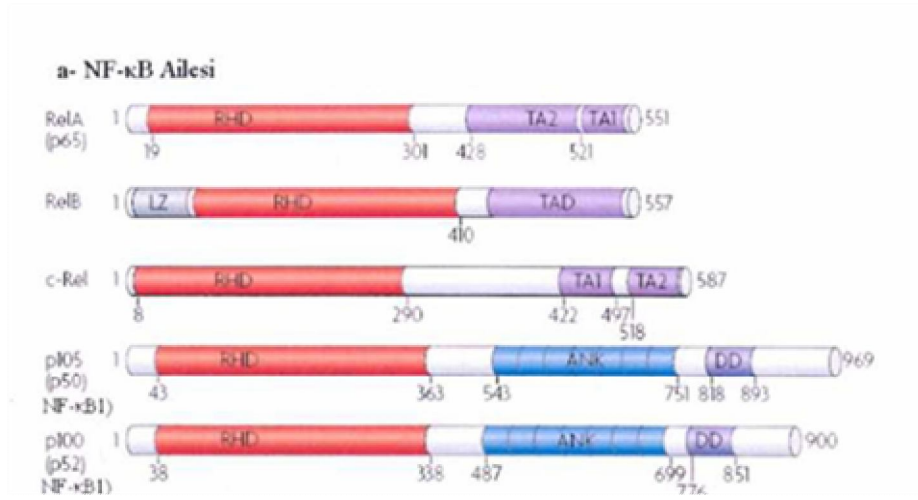
1. NF-κB 1 (p50/p105)
2. NF-κB2 (p52/p100)
3. RelA (p65)
4. RelB
5. c-Rel

BÜTÜN NF-κB ailesinin azaları, NT(nükleer translokasyondan) mesul olan muhafaza edilmiş olan Rel-homoloji sahayı (RHD) kullanırlar. RHD, proteinlerin amino tepelerinde olan takribi 300 a.a bölgesi içine alır (Dale ve ark. 2006). RHD'nin görevleri;

1. DNA'nın bağlanması,
2. proteinlerin dimerizasyonu,
3. NF-κB'nin intraselüler inhibitörü olan IκB ile etkileşimdir.

Bundan dolayı RH domaini korunmuş dizelere (DNA'ya bağlanma, inhibitöre bağlanma, dimerizasyon sağlayan ve nükleer lokalizasyon sinyal (NLS)) mevcuttur (Baldwin 1996; Kopp ve Ghosh, 1995).

Rel-A, RelB ve c-Rel; C-terminal sahasında NF-κB aracılığı ile gen trans-aktivasyonunda mühim bir yere malik olan trans-aktif domaini ihtiva eder. p50 ve p52'nin prekürsör moleküllerinin (p105 ve p100) C terminal bölgesi IκB ailesi üyelerinde de bulunur. IκB ailesi üyeleri IκBa, IκBb, IKBE, Bcl3 (Perkin 2007) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: NF-κB protein aileleri'nin üyeleri (Memeli hücrelerinde 5 adet nükleer faktör (NF)-κB üyesi bulunmaktadır. RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) ve p52/p100 (NF-κB2).

NF-κB ailesine mensup olan proteinler ve NF-κB ya bağlı olan tüm alt ünitelerin transkripsiyonel olarak etkili ve dominant biçimlerini meydana getiren homodimerler ve heterodimerleri oluştururlar. Bunların tek istisnası RelB dir. Çünkü RelB proteini yalnızca heterodimerizasyon meydana getirir (Morgan ve Liu 2011). NF-κB ailesin de bulunan en aktif biçimleri; p50, p52 ve p65 subunitlerinden teşekkül eden heterodimerlerdir. NF-κB'nin prototipik biçimi, çok fazla görülen biçimdir. Ayrıca p50/p65 subunitlerinden meydana gelir (Hassa ve Ark. 2003). P50/p50, p52/p52, RelA/RelA homodimerleri gibi diğer dimerik kompleksler, aynı zamanda başka hücre tiplerinde de bulunmaktadır (Barkett ve Gilmore 1999). Ancak bu dimerlerin transkativasyonel özellikleri hala aydınlatılabilmiş değildir (Chen ve ark. 1999). Tüm NF-κB dimerlerinin umumi olarak κB (Genom üzerine bağlanma bölgesi) bağlayıcı motifine bağlanır. Buna karşın daha değişik dimerler κB motifleri tanımakta ve bağlanabilmektedir.

2.6.1. NF-κB tarafından düzenlenen genler

Hücrede uygun şartlarda inhibitör proteini olan IκB, NF-κB ile nonkovalent etkileşim de bulunan iki proteinle kompleks oluşturmuş şeklinde sitoplazmada inaktif şekilde bulunur. IκB proteinleri, çekirdek ve sitoplazma aralığında NF-κB istikrarı elde ederler(Tuncay ve ark. 2010). NF-κB'nin aktif hale geçmesinde çeşitli uyarılar(viral

ürünler,UV ve bakteri vb.)sayesinde saniyeler içerisinde aktif(Aggarvval 2004). Hücrenin zarına ligand bağlanmasıyla, I/cp kinaz aktivasyonunun oluşması için anahtar enzim rolünde olan IKK gamanın alt birimleri ve enzim aktivitesi aktif olan iki alt birimi IKKa ve IKKp'den oluşur ve aktivasyonu sağlar. I/cp fosforile olunca I/tp'nin NF-κB'dan ayrılmasını sağlar. Ayrıca ubikitinasyon ve son olarak inhibitör proteinin 26 S proteozomlar ve diğer proteazlar tarafından proteolitik olarak degradasyonu ile sonuçlanır. Yukarıda anlatılan yolak çok sık kullanılan prototipik heterodimerlerin p50/RelA'nın aktifleşmesine neden olur. (Gerondakis 1999).

NF-κB'nın çekirdeğe giriş yapması için inhibitör proteininde ayrılması ve aktifleşmesi gerekir. Bu sayede NF-κB çekirdeğe girebilir. Transkripsiyonun başlaması için NF-κB dimerlerinde , amaçlanan genlerin promoter bölgelerinde yer alan dekamerik motiflere, ‘‘GGGRNNYYC (κB motif)”, tutunarak gen transkripsiyonunu başlatır (Chen ve ark. 1999). Bu sayede NF-κB transkripsiyonun aktif hale geçmesine yardımcı olur (Hayden and Ghosh, 2004).

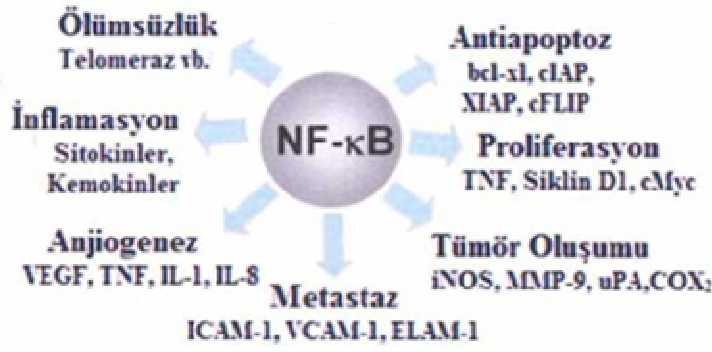
Ökaryotik hücrelerde, transkripsiyonel etkeni olarak fonksiyon gören NF-κB, inflamatuvar ve immün yanıtların merkezi bir düzenleyicisidir. İmmüitenin düzenlenmesi, hücrenin büyümesi, inflamasyon, lenfositin aktif hale geçmesi, hücrenin farklılaşması, sağkalım, nekroz ve apoptozun hücreyel olaylarında rol oynar(Richmond 2002). Önemli organ hastalıklarının bir çoğunun patofizyolojisinde önemli rol oynar. NF-κB'ün aktifleşme sistemindeki en küçük bozukluk, bulunduğu hücrenin apoptoz veya nekroz' girmesini tetikler.

NF-κB aracılığı ile hücrenin immün(doğal yada sonradan kazanılmış) yanıtını ilgilendiren bir çok genin(>200) aktif hale geçmesini sağlar. Aynı zamanda İmmün yanıtı olumsuz etk,leyecek bir çok genin baskılanmasını sağlar. NF- κB'nın ekspresyonundan sorumlu olduğu genler; büyüme faktörleri, hücre adezyonunun molekülleri, immünreseptörler ve bazı akut faz proteinlerini kodlayan genlerden sorumludur. Bu faktörler; IL-2, IL-6, IL-1p, TNF-a gibi sitokinler, IL-8 gibi kemokinler, G-CSF ve GM-CSF gibi koloni stimüle edici etkenler, bazı interferonlar sayılabilir (TABLO 2-2).

Tümör nekroz faktör ailesi	• TNF-a • TNF-Z
İnterlökin ailesi	• IL-1 <i>b</i> • IL-2 • IL-6 • IL-12
Kemokin ailesi	• IL-8 • MUM • MCP-1 • RANTES
Koloni Stimüle Edici Faktörler	• G-CSF • GM-CSF
İnterferon ailesi	• IFN6

TABLO 2-2: NF-kB tarafından düzenlenen immiın sistem elemanları

IkB'nin fosforile olmasını etkileyen hücresele etkenler NF-kB'nın aktif hale geçmesinide etki edebilir. IkB'nin fosforile olmasını etkileyen etmenlerden bazıları; UV, LPS, bakteri veya virus ürünleri fosforilasyonu etkiler. (Shall ve Murcia 2000; Hassa ve ark. 2001). NF-kB ile hücre arasında gerçekleşen olaylar; Hücre- hücre adhezyonu, hücre'nin iyileşmesi, inflamatuvar hücrelerin göçü, öncül patojenik sinyallerin yayılması ve genişlemesi, tümörigenezin başlaması ve hızlanması gibi olaylardır(Feinman ve ark. 2004).(Şekil 2-13)



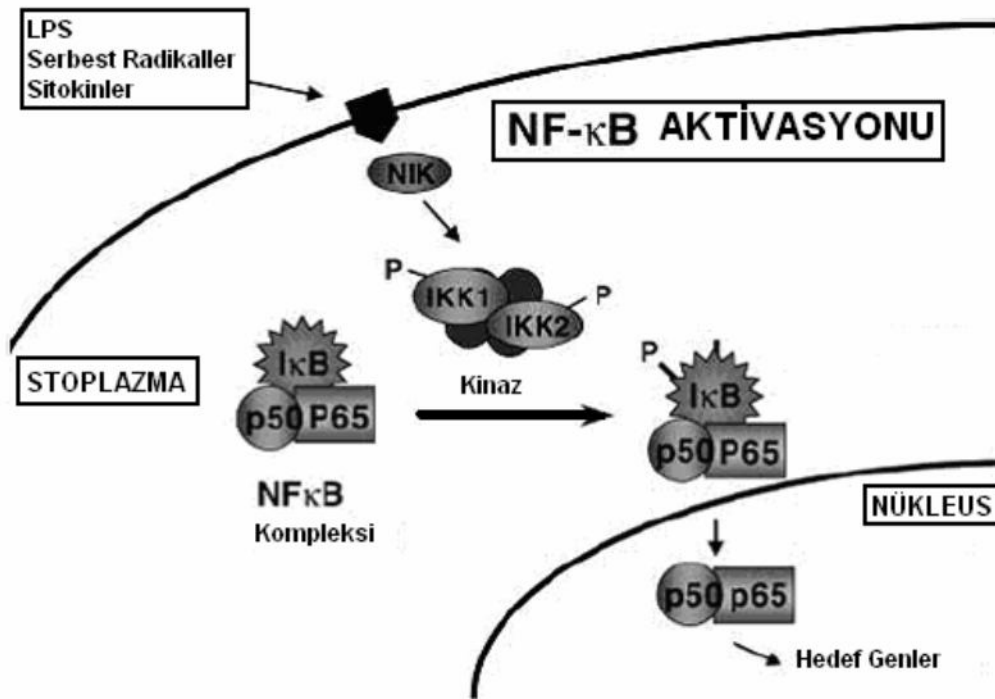
Şekil 2-13: NF-κB tarafından düzenlenen genler

NF-κB'nin eksik yada yanlış aktifleşmesi sonucunda; otoimmün artrit, astım septik şok, akciğer fibrozisi, glomerulonefrit, aterosklerozis ve AIDS gibi bazı hastalıklarla eksikliğin neden olduğu görülmüştür (Barnes ve Karin 1997). NF-κB'nin aktif hale geçmesinin, kanserleşmiş hecrelerde artış, invazyonu, anjiogenezi ve kanser hücrelerinin yayılmasını sağladığı ortaya konmuştur. (Ueda ve Richmond 2006, Gilmore ve ark. 2002).

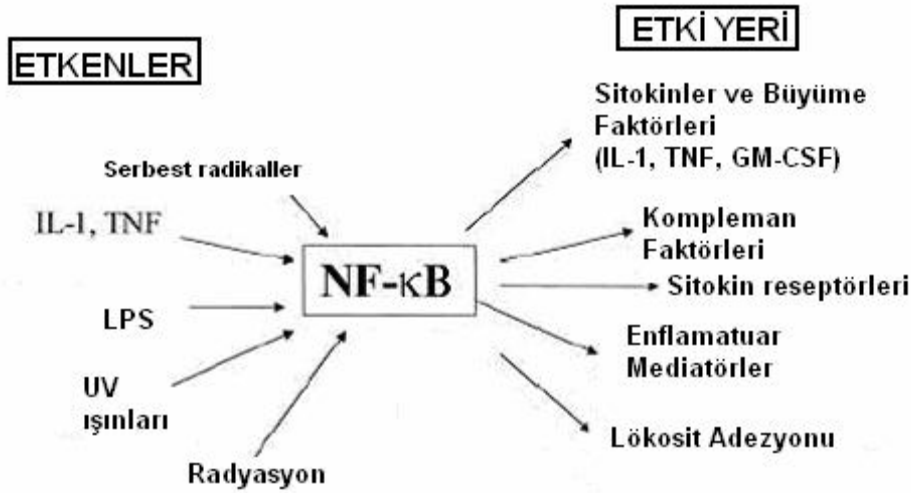
2.6.2. NF-κB Aktivasyonunun Hücre Biyolojisine Etkileri

NF-κB'nin aktifleşmesi sayesinde Makrofajlar, T hücreleri ve farklı hücrelerden üretilen pro-inflamatuar sitokinler tarafından, hedeflenen hücreleri (Şekil 2-14) gösterirler (Ghosh S1998, Baeuerle PA.1998). Birçok proinflamatuar sitokinler IL-1 ve TNF-a için reseptör ekspresyonu yapar ve isaret transdüksiyonu için gerekli olan IKK kompleksini de içerirler. Lokosit, vasküler endotel ve düz kas hücreleri, kardiyomyositler ve fibroblast gibi hücreler pro-inflamatuar sitokinlere NF-κB'nin aktifleşmesi sayesinde cevap verebilirler (Baeuerle PA1998, Baldwin AS.1996). IL-6 ve IL-12 gibi birçok sitokin ve ICAM-1, VCAM-1, E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin, matriks metalloproteinaz, siklooksijenaz-2 ve iNOS'un kodlanmasını içeren gen ekspresyonunun artmasına neden olur (Collins T,1995, Warner S.1987). Bunlara ek olarak, NF-κB'nin aktif hale geçmesiyle pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu pozitif "feedback"e yol açar. IL-6'nın bırakılmasında rolü olan, NF-κB'nin hususiyle beyin dokusunu uyarak sistemik inflamasyona neden olur. Bu sayede IL-6 salıverilir (Akira S,1990) (Şekil 2-15).

NF- κ B'nin yolağı mikrobiyal ürünler tarafından da kullanılır. Hususiyle gr (-) bakterileri endotoksini LPS'in "toll-like reseptör" den bir reseptöre bağlanmasıyla NF- κ B'dan uyarılar başlar (Medzhitov R, 1997, Aderem A.2000). Yeni yapılan çalışmalar'ın insan ve memelilerde uyarıcı LPS reseptörünün TLR-4 olduğu ortaya konmuştur (Medzhitov R, 1997, Aderem A.2000). TLR'ler, NF- κ B ve son ürün olarak NO (nitrik oksit)'nin evrimsel düzlemde eski moleküllerdir ve patojenlere karşı çok hücreli organizmaları korumada TLR/NF- κ B aracılı yanıt anahtar mekanizmadır.



Şekil 2-14: NF- κ B'nin aktivasyonu (David A, 2001)



Şekil 2-15: NF-κB aktivatörleri ve etki yerleri (David A, 2001)

2.6.3. Nükleer Faktör-κB (NF-κB) Transkripsiyon Faktörü Ailesi

İnsanlarda NF-κB1, NF-κB2, REL, RELA ve RELB'den oluşan beş genin ürünleri; NF-κB-(p105 ve p50), NF-κB2 (P100 ve p52), p65/RELA, RELB ve c-REL den oluşan transkripsiyon etkenleri ailesini meydana getirir. NF-κB'nın aktif formunu göstermesi için, polipeptidlerin homodimer veya heterodimer oluştururlar. Bu sayede NF-κB proteinlerinin aktif formu görülür (Gilmore, T.D.2006, Karin, M, 2000).

IκB protein NF-κB'nın sitozolde dimerleri aracılığı ile bağlanarak pasif kalmasını sağlar. IKK(IκB kinaz) aracılığıyla IκB fosforilasyona uğrayarak parçalanır ve NF-κB serbest kalarak aktifleşir. (Karin, M, 2002).

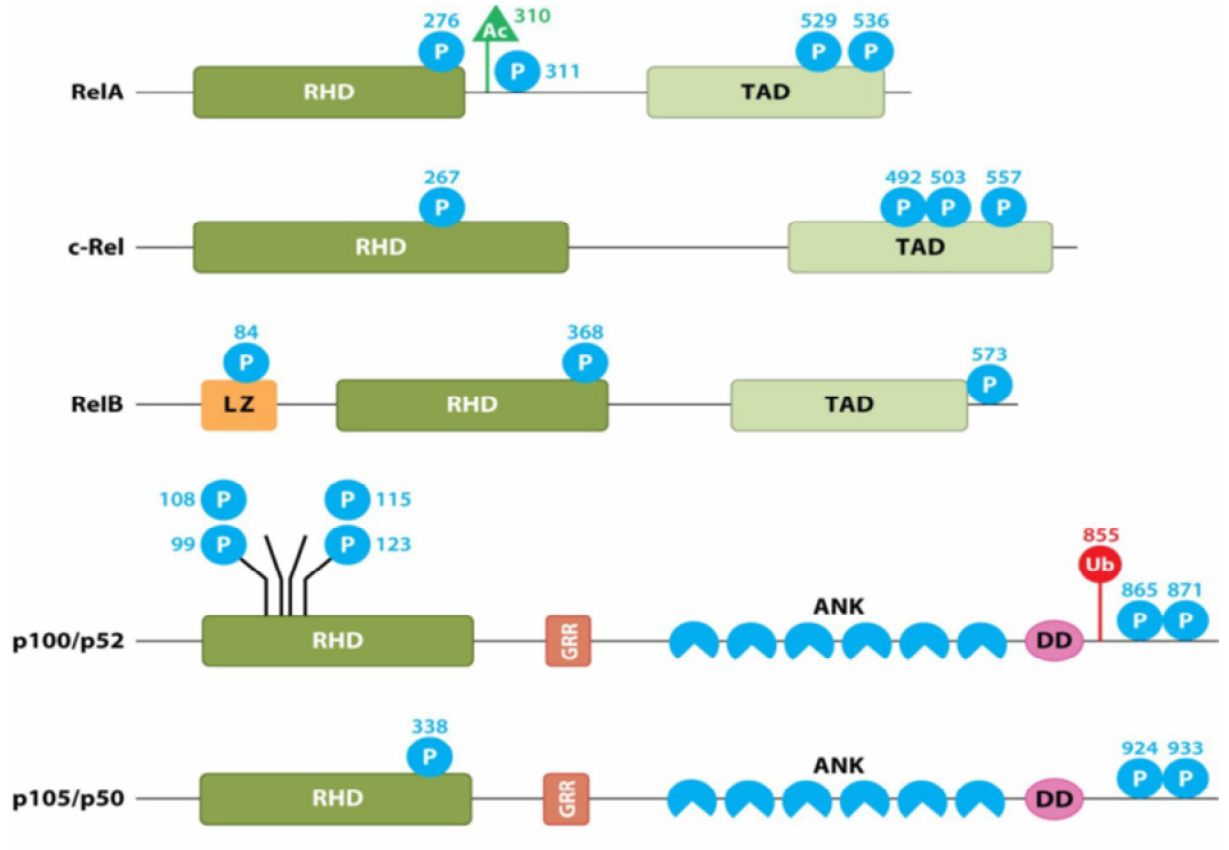
2.6.4. NF-κB Proteinlerinin Yapısal Olarak İncelenmesi

NF-κB ailesini oluşturan proteinlerin yapısı incelendiğinde (Şekil 2-16), tüm alt birimlerin amino-ucunda "Rel homoloji bölgesi, RHD" olarak adlandırılan yaklaşık 300 amino asit uzunluğunda bir dizinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgede ki dimerlerin oluşumu ve sitozolden nukleusa geçişinde, DNA'ya bağlanması ve IκB proteinleriyle etkileşimden mesuldür (Vallabhapurapu, S2009, Huxford, T,2011, Hayden2008).

RHD'nin yapısıyla ilgili ilk veriler, κB DNA'ya mensup NF-κB p50:p50 homodimerinin Kristal yapısından meydana gelmiştir (Ghosh, G 1995). NF-κB p50: DNA teşkilinin tetkikiyle RHD'nin immünoglobulin oluşumuna benzer çift katlanmış muntıkadan oluşur. Amino ucu, ortalama 160-210 a.a.uzunluğundadır, DNA'nın

bağlanmasından mesul bölgesidir. Karboksil uca bulunan “DD (dimerizasyon bölgesi)” takribi 100 a.a uzunluğundadır. Strüktürel olarak hususi başka bir saha da “NLS (nükleer lokalizasyon dizisi)” özgür NF- κ B dimerlerinin nukleusa geçirilmesini sağlar. NLS bölgesinin I κ B proteinini gibi değişik strüktüreyapıyı bağlayabilecek konformasyonel elastik yapıya (Huxford, T, 2011).

RHD protein NF- κ B’nın ortak yapısal proteindir. RHD’nin dışında yalnızca RelA, RelB ve c-Rel alt ünitelerin strüktüründe “, TAD (transkripsiyonal aktivasyon bölgesi)” bulunmaktadır. TAD bölgesiyle ilgili elimizde yeterli very bulunmamaktadır. TAD bölgesinin a.a dizileri olarak alt ünitelerinde değişiklik görülmektedir. (Huxford 2009)).



Şekil 2-16: NF- κ B alt birimlerinin genel yapısı. RHD, Rel homoloji bölgesi; TAD, transkripsiyonal aktivasyon bölgesi; LZ, lösin fermuarı motifi; GRR, glisin amino asidi bakımından zengin bölge; ANK, ankirin tekrarları bölgesi. Translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonlardan P, Fosforilasyon; Ac, Asetilasyon ve Ub, Ubikutinasyon. Vallabhapurapu ve Karin (Vallabhapurapu,2009)’den alınmıştır.

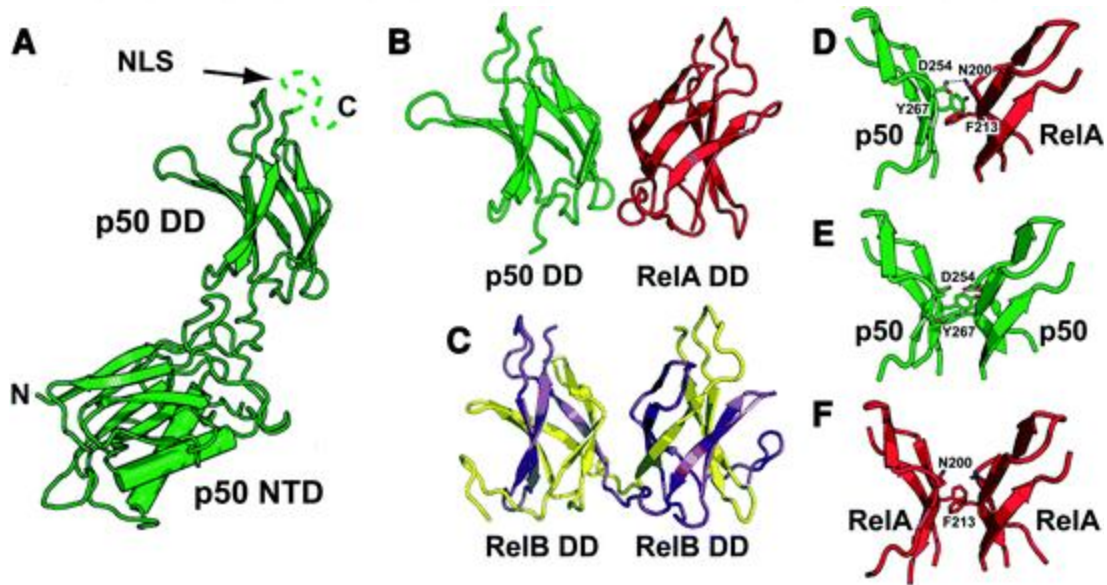
p50 ve p52 alt ünitelerinin strüktüründe TAD yoktur. TAD’ın yerine, “, GRR(glisin amino asidi bakımından zengin)” denen bölgesi vardır. Bu p50 ve p52’nin alt üniteleri sayesinde nukleusu aşp DNA’ya bağlamasını sağlar. Yalnız hedeflenen

genlerin ekspresyonunu arttırması gerekirken transkripsiyonun durdurulmasına yol açar. Transkripsiyon enzimlerinin aktifleşmesinde görev alan NF- κ B'nin dimerlerinin meydana gelmesinde TAD bulundura RelA, RelB ve c-Rel alt ünitelerinden en az bir tanesinin bulunması gerekir (Huxford 2009).

RelB'nin amino kısmında bir "LZ (lösin fermuarı)" motifi görülür. Bu motif bölgesi transkripsiyonun tanzim edilmesinde mühim bir yere sahiptir. Bu moleküller değişik bölümlerden oluşur. Translasyondan sonra oluşan ürünlerde meydana gelen modifikasyonların bir kolu(fosforilasyon ve asetilasyonlar gibi), DNA'ya angaje olması ve transkripsiyonla alakalı etkinliklerin organizasyonunda mühimdir (Perkins, N.D. (2006)).

2.6.5. NF- κ B Dimerlerinin Oluşumu ve DNA'ya Bağlanması

2.1. RHD ortamında görev alan ve ortalama 100 a.a.'den oluşan DD'nin yardımı ile dimerler meydana gelir. NF- κ B'nin alt ünitelerinin bünyesi , X-ışını kullanılarak tetkik edilmiş ve DD'nin bir kaç adet anti-paralel beta katman meydana geldiği bu katmanın immünoglobulinlere de benzediği saptanmıştır. (Şekil 2-17)(Huang, D.B 1997).

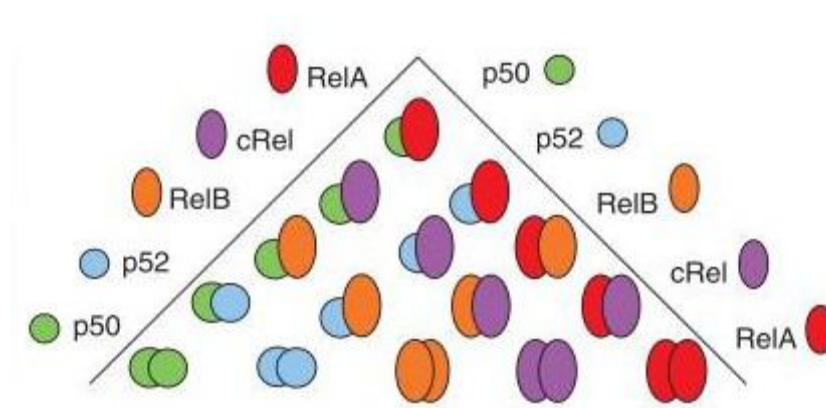


Şekil 2-17: NF- κ B'nin Rel homoloji bölgesi ve dimer oluşumu. A, NF- κ B p50 alt biriminin RHD yapısı; B, p50 (yeşil) ve RelA (kırmızı) alt birimlerinin oluşturduğu dimer yapısı; C, RelB homodimer yapısı (iki alt birimin DD bölgeleri ayrı renklerde gösterilmiştir, sarı ve MOR); D, p50: RelA dimerinin ara yüzü; E, NF- κ B p50 homodimerinin DD ara yüzü; F, RelA homodimerinin oluşturduğu ara yüz. Huxford ve diğ. (Huxford, T., 2011)'nden alınmıştır

Polipeptid dizisi ile bir grup a.a diğer birkaç a.a ile etkileşime girerler ve protein-protein kompleksi oluşur. Bu kompleks neticesinde bir ara yüz oluşur. Bu ara yüz dışında bir a.a öbeği daha vardır (Huxford, T 2009). NF- κ B'nin alt üniteleri arasında iki alt ünitenin ilişkisiyle dimer oluşur. Bu dimerler oluşması neticesinde, bir alt ünitenin DD'sinde beta-tabakasından birisi başkasının DD'siyle etkileşir ve "dimer ara yüzü" oluşur. Dimerlerin teşekkülünde 14 a.a vazifelidir (Sengchanthalangsy, 1999).

Yapılan deneylerde (Kristal yapı analizi) dimer konformasyonlarının hangisinin en çok kullanıldığı ile ilgili veriler (Huxford, T., 2011). En fazla istikrarlı dimer ara yüzü p50:p65/RelA aralığında oluşmuştur (Şekil .B, D). Bu heterodimer, p50:p50 (Şekil .E) veya p65/RelA: p65/RelA (Şekil .F) homodimerlerinden anlamlı derecede daha istikrarlıdır (Huxford, T., 2009, Huang, D.B., 1997).

Teorik olarak 5 tane NF- κ B alt ünitesinden onbeş değişik homodimer ve heterodimer teşekkül etme ihtimali bulunmaktadır (Şekil 2-18). Bu oluşan homodimer ve heterodimerler den oniki tanesi in vivo şartlarında saptanmıştır. Fakat geriye kalan 3 tanesi ise (RelB: RelB, RelB: c-Rel ve p52: c-Rel) in vivo şartlar da teşekkülü ile ilgili malumat bulunmamaktadır. Bununla beraber dimer teşekkülleri p65/RelA: RelB heterodimerlerin'in (Marienfeld 2009), birtakım hususi şartlarda teşekkül edebilir (Huxford, T 2009).



Şekil 2-18: NF- κ B'nin alt birimlerinin oluşturabileceği olası dimer kombinasyonları. O'Dea ve Hoffmann (O'Dea, E 2010)'dan alınmıştır.

Hücreler muhit şartlarına göre değişik sinyaller gönderir ve alırlar. Bu sinyaller hücre içerisinde değişik dimerlerin meydana gelmesini sağlarlar.

Bu olayların tamamı birtakım biyokimyasal tepkimeler neticesinde birkaç değişik evrede denetlenir. Bu denetleme mekanizmalarından bir tanesi, hücrenin ve uyarıcının çeşidine has bulunan RHD polipeptidinin salgılanmasıdır. Ötekisi monomerlerin kaynaşmasıyla veya ayrılmasıyla oluşan dimerlerdir. Bu dimerlerin üretim evresi, öteki dimerin stabilitesinin sağlanmasıyla I κ B:NF- κ B birlikteliğinin etkin olması önemlidir(O'Dea, E 2010).

RHD polipeptidi transkripsiyon sayesinde üretimi kontrol edilir. I κ B proteini dimerlerin sitozolde bulunmasına diğer bir değişle DNA'ya bağlanmasını inhibe eder. Bu durum dimerlerin monomerlerine parçalanmasını yavaşlatarak kararlı kalmalarını sağlar. (Barkett, M 1999).

Bununla beraber, p100 ve p105 moleküllerinin proteolizi ile p50 ve p52'nin meydana getirilmesi ile gelen sinyallere bağlıdır. Bu alt birimlerin strüktüründe TAD bulunmadığından dolayı c-Rel, RelB ve RelA meydana getirdiği dimerler transkripsiyon sayesinde aktif hale geçerler. Bundan dolayı homodimerleri transkripsiyonu baskılayıcı görevi bulunur(Li, Q.,2002).

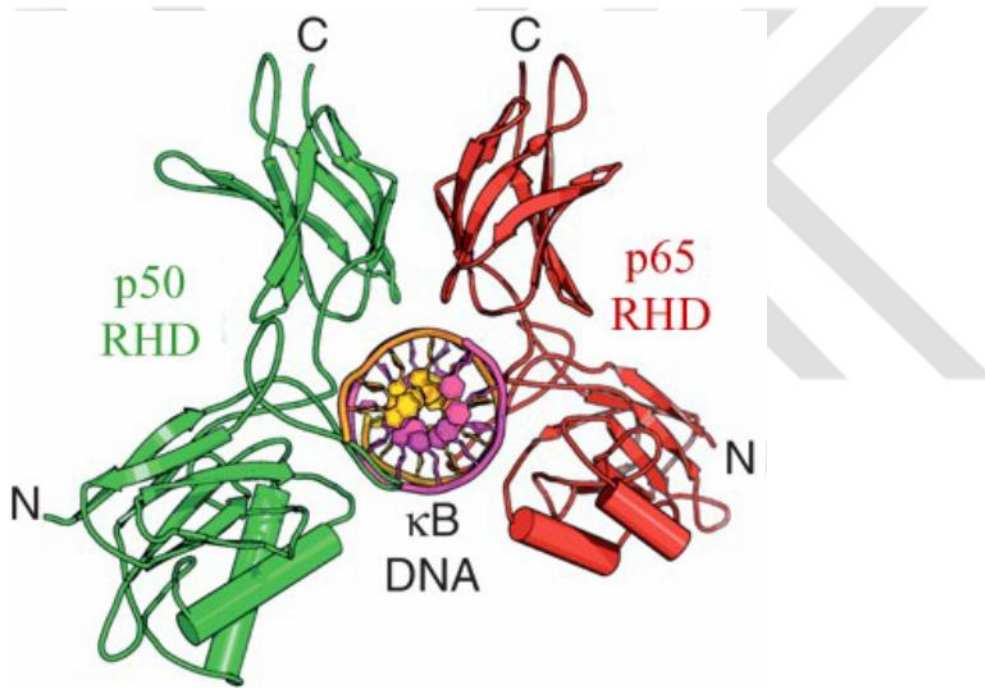
Farklı yapıdaki NF- κ B proteinleri, bağlanma bölgesinin çeşitliliğine göre farklı dimerler oluşturur; farklı I κ B proteinleri ile etkileşir (Barkett, M.,1999). Farklı NF- κ B dimerleri, çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlemek üzere, değişik uyaranlara cevap olarak, farklı hücre tiplerinde aktivite gösterir; diğer transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici proteinlerle farklı yollarda etkileşir.

O'Dea ve Hoffmann (O'Dea, 2010)'a göre, hücrenin tipine özgü dimer oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için, bazı hastalıklarla ilişkili hücreler kullanılabilir. Hücreler, böyle bir mikro-çevrede TNF, IL-1 (interlökin-1), IL-6 gibi enflamatuvar sinyallere sürekli maruz kaldığında denge seviyesindeki değişiklikler incelenebilir. Patolojik şartlarda ortaya çıkan dimer oluşumlarının da farklı olabileceği ileri sürülmektedir.

NF- κ B dimerlerinin DNA üzerindeki κ B bölgesine bağlı halde elde edilen kristal yapısından, iki NF- κ B alt biriminin RHD'lerinin dimer oluşturduğu yerde, ana oluk içinde bir tam dönüş boyunca, çift zincirli DNA ile sıkı bir etkileşim içinde 9 olduğu anlaşılmıştır (Ghosh, G. 1995). NF- κ B'nin amino ucu ve dimerizasyon bölgeleri hedef

DNA'nın etrafını kuşatır. DNA ile etkileşim, proteinin ikincil yapısındaki beta-tabakaları bağlayan dönüşlerdeki amino asitler aracılığı ile olur (Şekil 2-19).

X-ışını kristal yapıları oluşturularak dimerlerin bağlanma bölgelerinin incelendiği pek çok çalışma yapılmıştır (Berkowitz,2002, Moorthy,2007). Bu çalışmalarda, NF- κ B dimerlerinin DNA'ya bağlandığı bölgelerin nükleotit dizileri, dimerlerin bu bölgelere bağlanma şekli ve bu bölgeleri nasıl tanıdığına dair birçok bilgi elde edilmiştir. Bütün bu çalışmalardan, farklı dimerlerin farklı DNA dizilerini tanıdığı, konsensus dizilerin önemli derecede birbirinden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Huxford ve Ghosh (Huxford, T 2009), κ B bölgelerinin merkezinde yer alan nükleotitlerin bağlanmanın özgüllüğünü ve bağlanma afinitesini etkileyebileceğini belirtmişlerdir.



Şekil 2-19: NF- κ B p50:p65/RelA heterodimerinin κ B DNA bölgesi ile etkileşimi. Dimerlerin amino ucu DNA ile etkileşimden, karboksil ucu dimerizasyondan sorumludur. Huxford ve Ghosh (Huxford, T 2009)'tan alınmıştır.

Sonuçta, bir transkripsiyon faktörü olarak NF- κ B'nin temel rolü, konsensus dizisi 5'-GGGRNWYYCC-3' olan κ B bölgelerinin varyasyonlarına (R: A veya G; N: A, C, G veya T; W: A veya T; Y: C veya T) bağlanmaktır (Huxford, T., 2011).

İnsan genomunda yaklaşık 1.4×10^4 olarak hesaplanan olası κ B bağlanma bölgelerinin ilgili dimerler tarafından bulunup tanınmasının uyarıya özgü gen transkripsiyonunun önemli bir basamağı olduğu ifade edilmektedir. NF- κ B

proteinlerinin kromozomal olarak gömülmüş, birbirine çok benzeyen bu κ B bölgelerine ulaşmaları için özgül kromatin modifikasyonları ve konfigürasyonları gerekmektedir (Natoli, G 2005). Ancak, κ B bölgelerinin çeşitliliği gen düzenlenmesi için yetersizdir (Wan, F., 2007).

NF- κ B proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitesi, sitoplazma ve çekirdekte bulunan I κ B proteinleri, Rel alt birimleri, Rel proteinleri ile ilişkili diğer proteinleri, Rel olmayan alt birimleri kapsayan birçok basamakta kontrol edilmektedir. Rel ile ilişkili proteinlerin her geçen gün artan listesi, doku veya hücre tipine özgü bir düzenlenme mekanizması olduğunun diğer bir kanıtıdır (Wan, F.Y., 2009).

2.6.6. Nükleer faktör-kappaB1 (NF- κ B1)

NF- κ B1 geni 4q24 bölgesindedir (Şekil 2-20) ve 24 ekzon içerir. İnsan NF- κ B1 geni 2 adet protein kodlar:

- DNA bağlama sahası olmayan sitoplazmik bir molekül olan p105,
- p105 subunitinin C terminal bölgesinden türemiş DNA bağlama sahası içeren p50 proteini (Heron ve ark. 1995).



Şekil 2-20: NF- κ B1 geninin kromozom üzerindeki yeri

NF- κ B1, doğal ve kazanılmış immüitenin anahtar transkripsiyonel bir regülatörüdür. NF- κ B 1, makrofaj ve T hücrelerinde proinflamatuvar ve hücrel yaşamsal fonksiyonları yönetir. NF- κ B 1 ve onun inhibitör protein NF- κ BIA (I κ Ba, nükleer faktör-kappa B inhibitör alfa) geninde birçok polimorfik bölge tanımlanmıştır (Campbell ve Perkins 2006, Glavac ve ark. 1994). Bu polimorfizmlerin NF- κ B'nin işlevini potansiyel olarak etkilediği saptanmıştır (Curran ve Ark. 2002). NF- κ B'nin uygunsuz aktivasyonu, astım, enflamatuvar artrit, septik şok, akciğer fibrozisi, diyabet, kanser, AIDS, arterosklerozis ve felç gibi inflamasyon ile ilişkili çeşitli insan hastalıkları ve patolojik durumlarla ilişkili

olduğu saptanmıştır (Baldvin 2001, Chen ve ark. 1999).

2.6.7. NF-κB1 insersiyon/delesyon -94 ATTG Polimorfizm

NF-κB 1 geni promotör bölgesinde fonksiyonel polimorfizme yol açan dört nükleotid insersiyon/delesyon (-94 ins/delATTG polimorfizmi (rs28362491)) tanımlanmış ve bu polimorfizmin fonksiyonel rol olarak birçok hastalık ve kanserle ilişkili olduğu saptanmıştır. 4 bç delesyon sonucunda, nükleer proteinlere bağlanma kaybı ve geçici transfeksiyon deneylerinde NF-κB 1 promoter-luciferaz reporter oluşumundaki promoter aktivitesinin düştüğü saptanmıştır (Tuncay ve ark. 2010, Karban ve ark. 2004).

2.7. Toll Like Reseptörler

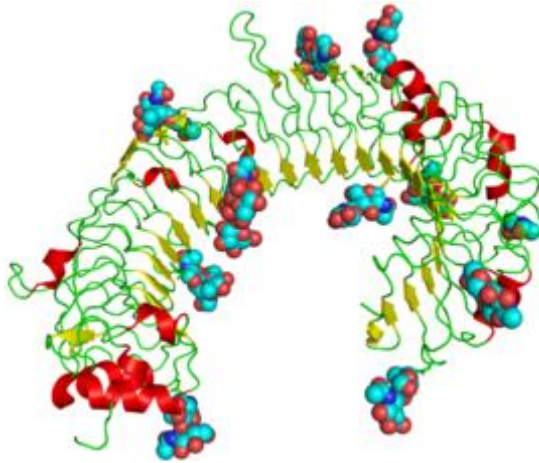
2.7.1. Tarihçesi

Toll benzeri reseptör (TLR), adını ilk defa 1985 yılında bir meyve sineği olan *Drosophila*'de tanımlanan Toll geninin sentezlediği proteine olan benzerliğinden dolayı almıştır (Anderson KV). Hoffmann ve ark. Toll'un sineğin mantar enfeksiyonlarına karşı bağışıklık yanıtı oluşturmada rol oynadığını bulmuşlardır (Lemaitre B). İlk insan TLR'ü Nomura ve ark tarafından 1994'de tanımlanmıştır (Nomura N). Charles Janeway ve Ruslan Medzhitov 1997'de, bugün TLR4 olarak bilinen bir TLR'ün, dışarıdan antikorlarla bağlandığında, uygun bir bağışıklık yanıtını başlatmak için gerekli olan belirli genleri etkinleştirdiğini kanıtlamışlardır (Medzhitov R). İnsanlarda şu ana kadar enfeksiyonlara karşı konakçı savunmasında rol oynayan 13 çeşit TLR gösterilmiştir. Son birkaç yılda bu konuda yapılan çalışmaların sayısı hızlı bir biçimde artmış ve TLR'ün farklı patojenlerin tanınmasında ve ilişkili olarak savunmasında önemli bir sinyal reseptörü oldukları anlaşılmıştır. TLR-1, -2, -4, -5, -6 ve -10 çoğunlukla hücre yüzeyinde lokalize olup patojenlere spesifik molekülleri tanırlar. TLR-3, -7, -8 ve -9 ise intraselüler organellerin içinde lokalize olurlar (Steinman RM, De Smedt T).

2.7.2. Toll Like Reseptörler (TLR)

Toll like reseptörler tek membranlı, katalitik olmayan bir reseptör grubudur. İnsan epidermisi çok katlı stratifiye epitelden oluşmuştur ve konak için ilk savunma bariyerini oluşturur. Vücuda girmiş olan mikroorganizmaları tanıma ve bağışıklık yanıtını oluşturmada görev alırlar. TLR'lerin immün sistemde anahtar rol üstlendikleri düşünülmektedir. Enfeksiyöz hastalıklara karşı immün sistemin şekillenmesinde ve patojenin tanınmasında da katkılar vardır. Epidermiste; epitelyal orijinli keratinositler, kemik iliğinden köken alan langerhans hücreleri ve nöroektodermal orijinli melanositler olmak üzere üç ana hücre popülasyonu mevcuttur. Epidermiste major hücre popülasyonunu oluşturan keratinositler fiziksel bariyer olarak rol oynadıkları gibi ilk immün yanıtın oluşmasında da görev alırlar (Kim J).

Adaptif immün sistemin antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konaga ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara “hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (PAMP)” denilmektedir (C.A. Janeway Jr, R. Medzhitov, B.A. Beutler). Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de “Pathogen Recognition Receptor (PRR)” adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır (Underhill DM). TLR'ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP'ları tanırlar (Şekil 2-21).



Şekil 2-21: Toll like reseptörü

TLR'ler, ekstrasellüler domain LRR (lösinden zengin tekrarlar), transmembran domain ve sitoplazmik domainden oluşan üç genel yapısal özelliğe sahiptir (B.A. Beutler). LRR domainleri her biri 24-29 aminoasit uzunluğunda olan lösünlerin tekrarından oluşur (Akira S.), ligand bağlama ve sinyal iletiminde önemlidirler (Modlin RL.). Sitoplazmik sinyal domaini interlökin 1 reseptör (IL-1R) ile benzer özelliktedir ve Toll/IL-1R (TIR) domaini olarak adlandırılır. TIR domaini yaklaşık 200 aminoasit içerir ve sinyal için esastır (C.A. Janeway Jr, R. Medzhitov, B.A. Beutler). TLR, PAMP ile bağlandığında, intrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolu aktive olur. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir. Bunlara ek olarak dendritik hücrelerin matürasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artış neticesinde, doğal immün sistem adaptif immün sistemi bir tehlikeye isaret edercesine yönlendirmektedir (Tuba Turul). TLR'lerin ekspresyonu sabit olmayıp patojenlere, sitokinlerin çeşitliliğine ve çevresel streslere cevapta hızla düzenlenir.

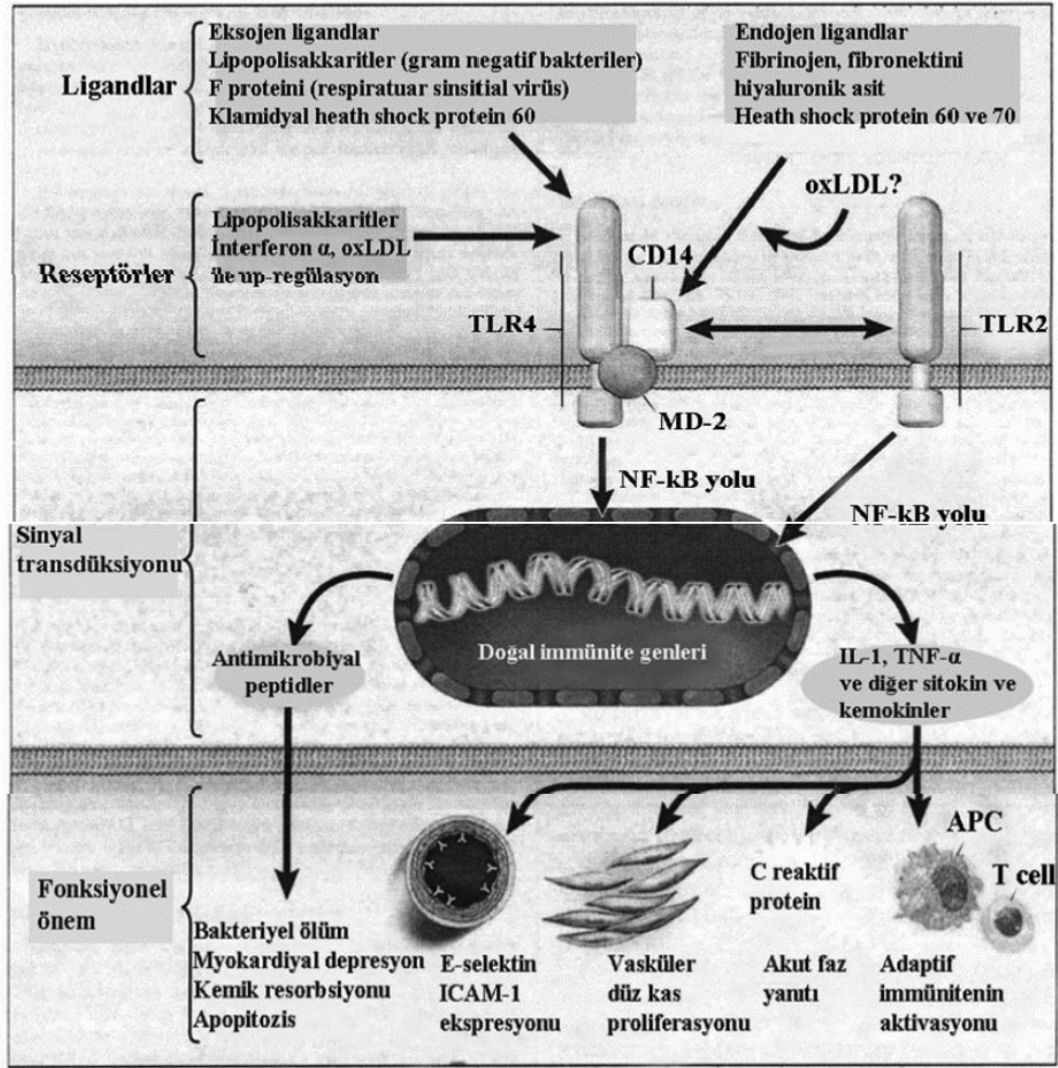
İnsan TLR genlerinin kromozom 4p14 (TLR-1), 4q32 (TLR-2), 4q35 (TLR-3), 9q32-33 (TLR-4), 1q33.3 (TLR-5), 4p16.1 (TLR-6), Xp22.3 (TLR-7), Xp22 (TLR-8) ve 3p21.3 (TLR-9) üzerinde olduğu gösterilmiştir. (Utahaisangsook S) TLR-1, TLR-2 ve TLR-6 lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi gram pozitif bakterilerin hücre duvar elemanlarını (Amersfoort ESV,), TLR-3 viral çift sarmal RNA'nın, TLR4 gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkaridlerin (Poltorak A), TLR-5 bakteriyel flagellinin (Hayashi F), TLR-7 ssRNA, TLR-8 ve TLR-9 bakteri veya virüs DNA'larının CpG tanınmasında görev alırlar (McCluskie MJ, Krieg AM). TLR-4 gram negatif bakterilerde lipopolisakkaridlerin sinyal reseptörüdür. TLR-4 ayrıca gram pozitif bakterilerin lipoteik asitlerinin de bağlayabilme özelliğine sahiptir (Jugeau S). İnsan keratinositlerinde eksprese edilen TLR'ler den en önemlileri TLR-2 ve TLR-4 tür. TLR-2 lipoprotein, lipopeptid, peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipoarabinomannan, glikoinositolfosfolipid, glikolipid, ve zimosan gibi hücre yapılarındaki farklı molekülleri tanır (Kawai K, Shimura H). TLR-11 sadece farelerde işlevsel olarak tanımlanmıştır. İnsanlarda fonksiyonel değildir (Kawai K, Shimura H).

TLR aracılı NF- κ B'nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetikler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon

sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir (McInturff JE,). TLR aktivasyonu, patojenlerin konak hücreleri tarafından fagositozu için gereklidir. TLR patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içeriğine karşı gelisen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve fagozomun matürasyonuna yardımcı olur. Böylelikle fagosite edilmiş bakterinin öldürülmesi kolaylaşır (McInturff JE,).

TLR aktivasyonu çeşitli antibakteriyel moleküllerin salınmasını da uyarır. TLR, farede intraselüler patojenlerin öldürülmesini sağlayan reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin üretimine ve salgılanmasına neden olur (Thoma-Uszynski S,). İnsan keratinositleri *S. aureus* ile uyarıldığında TLR2 tarafından, NF-kB aracılığıyla nitrik oksit sentetaz, siklo-oksijenaz-2 ve IL-8 gen aktivasyonları sağlanabilmektedir (Kollisch G,). TLR aktivasyonu apoptoza da neden olabilir. Lipopolisakkaritlerin (LPS) ya da lipoproteinlerin, TLR4 ve TLR2/6 üzerinden apoptoza uyarabildikleri gösterilmiştir. TLR+ enfekte hücrelerin apoptoza uğraması, konağın enfeksiyonu ortadan kaldırmasına yardımcı olabilir (McInturff JE).

Bellek T hücreleri üzerinde bulunan TLR2, aynı ajanla tekrar maruz kalındığında immün sistemin daha erken ve hızlı uyarılmasını sağlar. Otoimmün hastalıklarda, mikrobiyal enfeksiyonların ataklara neden olması aynı mekanizmayla olmaktadır (Xu D, Komai-Koma M) (Şekil 2-22).



Şekil 2-22: TLR-4 ve TLR-2 ligandları ve fonksiyonel önemi

2.7.3. TLR'nin Yapısı ve Fonksiyonu

TLR, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşan bir transmembran proteinidir. Sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve bu nedenle Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit içeren, lösinden zengin tekrar (LRR) motifleri bulunur. Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülür.⁴ İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış 10 üyesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur.⁵ Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan TLR'ler "patojenle ilişkili moleküler patternler (PAMP)" adı verilen bölgeleri taşıyan endojen

veya eksojen ligandlar tarafından uyarılır (Tablo 2-3). TLR aktivasyonu sonucu patojenlere karşı konakçı cevabı ve otoimmün yanıt oluşur.

Reseptör	Endojen ligandlar	Eksojen ligandlar	Başlıca sentezlenen inflamatuvar sitokin ve kemokinler
TLR-1		Triasil lipopeptitler(Shimizu T,2007) Soluble faktörler (N.meningitidis)(Wyllie DH,200)	IL-6, IL-10, TNF-alfa
TLR-2	HSP 70(Asea A,2002) HMGB1(Park JS,2004) HSP 60 (Vabulas RM,2001) Nekrotik hücreler(Li M,2001) Apolipoprotein CIII(Kawakami A,2008) Okside LDL(Holvoet P,2006) Serum Amiloid A(Cheng N, 2008) Amiloid beta(Jana M,2008)	Bakteriyel Lipoproteinler / Lipopeptitler(Takeuchi O,2000) Peptidoglikan(Nijhuis MMO,2007) Zymosan (mantar)(Roeder A,2004) Viral zarf glikoproteinleri(Bieback K,2002) Sentetik bileşikler (Diacil ve triasil lipopeptitler(Takeuchi O,2000)	IL-6,TNF-alfa, IL-1beta, IL-10
TLR-3	mRNA(Kariko K,2004)	Viral dsRNA(Alexopoulou L,2001) Sentetik bileşikler (Poly-I,C) (Smith KD,2009)	IFN-gama
TLR-4	HSP60 (Vabulas RM,2001) HSP70(Asea A,2002) Fibronektin(Okamura Y, 2001) Hyaluronan(Taylor KR,2004) Heparan Sulfat(Kodaira Y,2000) Fibrinojen(Hodgkinson CP,2008) Beta-Defensin 2(Biragyn A,2002) Okside LDL(Xu XH,2001) Akciğer surfaktan protein-A(Guillot L,2002) Tenascin C (Midwood K,2009)	Lipopolisakkaritler(Poltorak A,1998) Viral zarf glikoproteinleri(Kurt-Jones EA, 2000) Sentetik bileşikler (Monophosphoryl lipid A)(Smith KD,2009)	IFN-gama, IL-1 beta
TLR-5		Bakterial flagellin(Hayashi F, 2001)	IL-6, TNF-alfa, IL-10
TLR-6		Diacil lipopeptitler (Mycolpasma)(Buwitt-Beckmann U, 2005)	IL-1 beta
TLR-7	ssRNA(Smith KD,2009)	ssRNA (Virus)(Heil F, 2004) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline, RNA, loxoribine, bropirimin)(Andreacos E, 2004)	IFN-gama
TLR-8	ssRNA(Smith KD,2009)	ssRNA (Virus)(Heil F, 2004) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline)(Andreacos E, 2004)	IFN-gama
TLR-9	CpG DNA(Smith KD,2009)	CpG DNA (bakteri ve virus)(Hemmi H,2000 ve Krug A,2004) Sentetik bileşikler (CpG Oligonukleotidler)(Smith KD,2009)	IFN-gama

Tablo 2-23 : TLR'nin endojen ve eksojen ligandları ile sentezini indüklediği inflamatuvar mediatörler

2.7.4. TLR-2 Geni ve Fonksiyonu

TLR-2 geni 4q32 bölgesinde yer almaktadır. 4, 2 kb'lık bir transkript ekspres eder. TLR2 mRNA ekspresyonu beyin, kalp, akciğer ve dalak dokularında gözlenir ve özellikle myelomonositik orjinli periferik kan lökositlerinde (PBL) en yüksektir (Rock FL). TLR-2 geninin kodlama yapan tek ekzonu 84kDa moleküler ağırlığında 784 amino asitlik bir ürün oluşturmaktadır (www.ensembl.org). TLR-2, insanda tanımlanan 5 TLR'den biridir ve bu moleküller arasında üzerine en çok çalışma yapılmış olan reseptördür. Gram pozitif bakterilerden kaynaklanan lipoproteinler, lipopeptidler, lipotekoik asit ve peptidoglikanları içeren PAMP'ları tanır (Arancibia SA). Aynı zamanda TLR-2 mantar kaynaklı zymosan'ı (Sato M.), mikobakteriden kaynaklanan lipoarabinomannanı (Wieland Cw.), Staphylococcus'tan kaynaklanan fenol-çözücü modulin'ni (Ozinsky A.), Trypanosoma cruzi'den kaynaklanan glikozilfosfatidilinositol'u (Campos MA) da tanımaktadır. TLR-2 aktivitesini ve ekspresyonunu tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve glukokortikoidler gibi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar moleküllerin bir araya gelerek düzenlendiği belirtilmiştir (Hermoso MA 78). TLR-2 birbirinden farklı birçok ligandı birbirine bağlama yeteneğine sahiptir. Bu yeteneği özellikle TLR-6 ve TLR-1 ile oluşturduğu heterodimer yapıya dayandırılmıştır. TLR-2, diğer TLR'ler ile fonksiyonel heterodimer oluşturarak özgüllük içeriğini genişletir (Wyllie DH.).

TLR-2'nin hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerini tanıyan reseptör olduğu kabul edilmiştir (Underhill DM, İnci A, Bişkin Z). TLR-2'nin ligandları tanınması, sinyal iletimi oluşturabilmesi için diğer TLR ler ile dimerize olması gerekmektedir. Örneğin peptidoglikan TLR-2 ve TLR-6'nın oluşturduğu dimer aracılığı ile sinyal iletirler, ayrıca TLR-2 ve TLR-6 mikoplazma lipoproteinlerinin tanınması için gereklidir (Akira S., İnci A).

LPS sinyal transdüksiyon kaskadında yer alan moleküller, sepsisin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel hedef moleküllerdir. TLR-2 ve TLR-4 inhibisyonu kullanarak, sepsiste dahil olmak üzere bir çok kritik hastalıkta terapötik yaklaşımlar sağlamıştır (Mullarkey M, Rossignol DP). Günümüzde giderek artan bir şekilde TLR-2 ve TLR-4 ün deneysel düzeyde organ disfonksiyonuna neden olduğu yapılan çalışmalarla gün yüzüne çıkmaktadır. Bu hastalıklar içinde sepsis, travma, iskemi repervizyon hasarı ve

hiperoksi yer almaktadır (Mullarkey M). TLR-2 ve TLR-4'ün etanol ve asetaminofen ilişkili karaciğer hasarında, ventilatör ve aspirasyon ilişkili akciğer hasarında ayrıca astım krizinde de rol aldığı bilinmektedir. Sepsis başta olmak üzere bir çok olayda TLR lerin önemi arttıkça bu reseptörler ile ilgili araştırmalar ilgi odağı olmuştur ve bu reseptörler önemli bir tedavi hedefi haline gelmiştir (Tablo 2-4).

TLR AİLESİ	Klasik ligandlar	Dagılım ve hücre lokalizasyonu	Transkripsiyon faktörleri	Sitokin indüksiyonu
TLR-1	Mikobakteri: tri-açıl peptidler	insan ve farelerde sık yüzey ekspresyonu. TLR2 ile heterodimerizasyon	NF-kB	inflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.)
TLR-2	Gram-pozitif bakteri: peptidoglikan, lipoprotein, ısı sok proteinleri	insan ve farelerde sık yüzey ekspresyonu. TLR1 ne TLR6 ile heterodimerizasyon	NF-kB	inflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.)
TLR-3	Virüsler: çift sarmal DNA (dsDNA) Sentetik: polinosik polisitilik asid	İnsan miyeloid dendritik hücrelerde (mDC) ve fare monosit ve mesengial hücrelerde hücre içi ekspresyon	NF- kB , IRF3,7	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.),IFN-1
TLR-4	Gram-negatif bakteri: LPS(korereseptör CD14, LBP,MD-2)	Yaygın yüzey ekspresyonu Sindirim sistemi epitelinde intrasellüler ekspresyon	NF- kB , IRF3,8	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.),IFN-2
TLR-5	Bakteri: flagellin	Sindirim sistemi epiteli dahil insan ve farede yaygın yüzey ekspresyonu	NF-kB	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.),
TLR-6	Mikoplazma: diaçıl lipoproteinler	Öncelikle insan ve farede mDC, mast hücre ve B hücre yüzeyinde ekspresyon TLR2 ile heterodimerizasyon	NF-kB	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.),
TLR-7	Virüsler: tek sarmal RNA Sentetik: imidazoquinolinler	İnsanlarda plasmasitoid Dendritik hücreler (pDC) ve B hücrelerde endosomal ekspresyon Farede mDCde ekspresyon	NF-kB , IRF3,6	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.), IFN-1
TLR-8	Virüsler: tek sarmal DNA Sentetik: imidazoquinolinler	İnsan miyeloid, NK ve T hücrelerinde endosomal ekspresyon Farelerde fonksiyonel değil	NF-kB , IRF3,7	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.), IFN-1
TLR-9	Virüsler ve bakteri: çift sarmal DNA Sentetik: CpG olidodeoksitükleotidler	İnsanlarda pDC, B hücreleri ve NK hücrelerinde endosomal ekspresyon Farelerde daha yaygın olarak doku ekspresyonu	NF-kB , IRF3,8	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.), IFN-1
TLR-10	Bilinmiyor	İnsan pDC ve B hücre yüzeyinde ekspresyon Farelerde bulunmaz	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR-11	Toxoplasma gondii: profilin Üropatojen bakteri	Fare üroepitel yüzeyinde eksprese edilir nsanlarda bulunmaz	NF-kB	İnflamatuar sitokinler (TNF- , IL-6 vs.),

Tablo 2-4: TLR ailesi ve ligandları

2.7.5. TLR-4

TLR-4 ilk *Drosophila* Toll'unun insan homologu olarak tanımlanmış ve ilk insan Toll'u (hToll) olarak adlandırılmıştır. TLR-4, 9q32-33 kromozomda kodlanan, 22 N terminal LLR içeren, 90 kDa moleküler ağırlığında 839 aminoasitlik bir proteindir. TLR-1 ve TLR-6 ile yakın ilişkilidir. TLR-4 mRNA'sı tek bir transkript olarak eksprese edilir ve en yüksek seviyelerde dalak ve PBL'ler de bulunur. TLR-4; B hücreler, DC'ler, monositler, makrofajlar, granülositler ve T hücreler tarafından sunulur (Ozinsky A.). Bazı çalışmalarda TLR-4'ün yalnızca miyelomonositik hücrelerde sunulduğu ve mononükleer hücrelerde en yüksek olduğu belirtilmiştir (Zarembek KA).

TLR-4 bir homodimer oluşturur ve MD-2 ilave komponenti ile ekstrasellüler birliktelik yapar. MD-2, LPS'nin TLR-4 aracılı tanınmasında gereklidir. TLR-2 kompleksleri LPS'yi tanıyabilmesine rağmen, TLR-4 genellikle LPS reseptörü olarak düşünülür. MD-2 ve TLR-4 homodimer birlikteliği LPS'yi direkt olarak bağlamaz. LPS, ilk soluble olarak LPS bağlayan protein (LBP) ile bağlanır. LBP'de ya soluble veya glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-bağlı CD14 ile bağlanır. Muhtemel olarak LPS tanıma kompleksi CD14, TLR-4 ve MD-2'yi içeren en az üç komplekse sahiptir. TLR-4 ve MD-2 sürekli olarak birbirleriyle birlikte iken CD14 LPS bağlandıktan sonra komplekse katılır. Kesin mekanizması henüz anlaşılamamasına rağmen LBP'nin LPS'yi CD14'e transfer ettiği ve böylece TLR-4'ün aktive olduğu düşünülmektedir (C.A. Janeway Jr.). TLR-4 ile LPS tanınmasında CXCR4, GDF-5, CD55, çeşitli ısı sok proteinleri (HSP70, HSP90) ve kompleman reseptörlerinin (CR) gerekli olduğu düşünülmektedir (Muzio M). TLR-4 kompleksleri aynı zamanda respiratuar sinsityal virüs (RSV), hepatit C virüs ve Mouse mammary tumor virus (MMTV) gibi virüsleri tanıır.

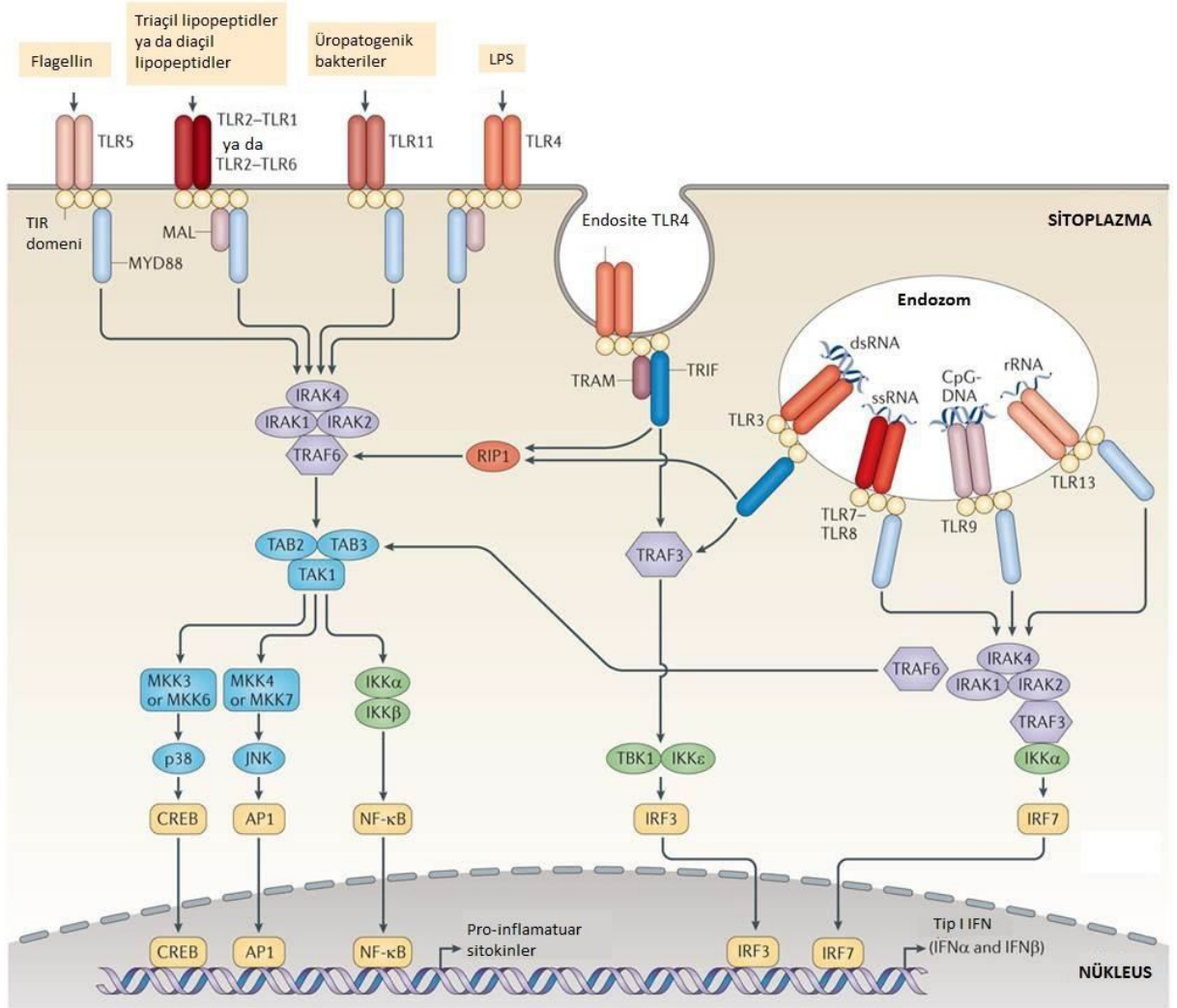
TLR-4 kompleksi; HSP'ler, fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A (SP-A) ve β -defensinler gibi endojen ligandları tanıyabilir (119). TLR-4 hem aktivitesini artıran TLR-5 ile ve hem de aktivitesini inhibe eden TLR-1 ile heterodimer oluşturur. TLR-4 geninde mutasyon olan C3H/HeJ türü fareler, gram negatif bakteriyel infeksiyonlara yüksek olarak hassastır. İnsan TLR-4 geninde polimorfizmler, artmış gram-negatif infeksiyon hassasiyeti ile ilişkilidir (Poltorak A.). TLR-4'ün aktivasyonu NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla edinsel immün cevaplarda çok önemli olan çeşitli sitokinlerin ve kostimülatör moleküllerin ekspresyonunu sağlar. Bu bulgular TLR'lerin doğal immün sistemin reseptörleri olarak fonksiyon görebildiğini göstermiştir (Metzhitov R.).

2.7.6. Toll like Reseptör Yolağı

TLR-5, TLR-11, TLR-4 ve TLR-2-TLR-1 ya da TLR-2-TLR-6 heterodimerleri, hücre yüzeyinde ilgili ligandlarına bağlanırken; TLR-3, TLR-7–TLR-8, TLR-9 ve TLR-13 mikrobiyal ya da konak-kökenli nükleik asitleri tanıdıkları endozomlarda yer alırlar. TLR-4 hem plazma membranı hem de endozomda konumlanmıştır. İlgili ligandların sebep olduğu reseptör dimerizasyonu ile TLR sinyalini başlatır. Bunu takiben, TLR'lerin TIR domenleri, MYD88 (myeloid differentiation primary-response protein) ve MAL (MYD88-adaptor-like protein) ya da TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β) ve TRAM (TRIF-related adaptor molecule) proteinleri ile etkileşime girer. TLR4, MYD88 sinyalini TRIF sinyaline dönüştürmek amacıyla plazma membranından endozoma hareket eder.

Sinyal adaptör moleküllerinin etkileşimi, IRAK'lar (IL-1R-associated kinases) ve adaptör moleküller TRAF'ların (TNF receptor-associated factors) etkileşimini içeren sinyal yolaklarını uyarır ve bu uyarım MAPK (mitogen-activated protein kinases), JNK (JUN N-terminal kinase) ve p38 aktivasyonu ile transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesine yol açar.

TLR sinyali ile aktive olan en önemli iki transkripsiyon ailesi NF- κ B ve IRF (interferon-regulatory factors) olmakla beraber CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) ve AP1 (activator protein 1) gibi transkripsiyon faktörleri de TLR sinyaline yanıt oluşturmaktadır (Tablo 2-28). TLR sinyalinin en önemli sonuçlarından biri pro-inflamatuar sitokinlerin ve IFN (type I interferon)'nin uyarılmasıdır.

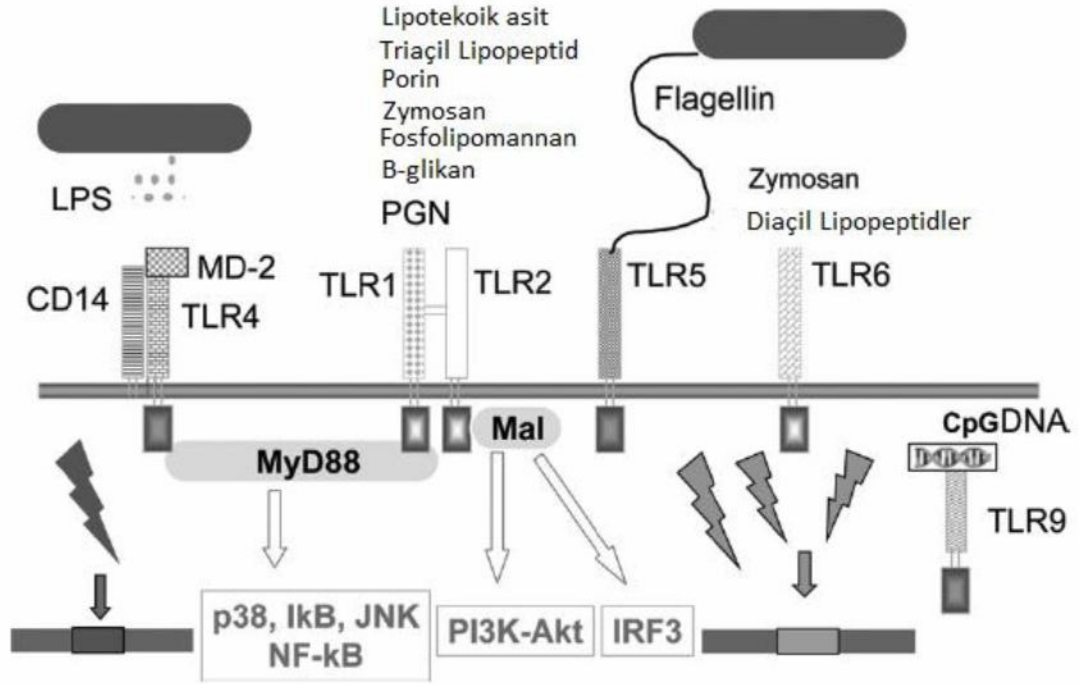


Şekil 2-23: TLR sinyali yolu I (58). dsRNA, çift iplikli RNA; IKK, NF-κB kinaz inhibitörü; LPS, lipopolisakkarite; MKK, MAP kinaz kinaz; RIP1, reseptör-ilişkili protein 1; rRNA, ribosomal RNA; ssRNA, tek-iplikli RNA; TAB, TAK1-bağlayıcı protein; TAK, TGFβ-aktive kinaz; TBK1, TANK-bağlayıcı kinaz 1.

TLR'ler, IL-1 beta üretimini arttırarak bakteriyel ve hasarlı hücre ürünlerine cevap oluşturan ve "İnflamazom" olarak adlandırılan NOD-like receptor (NLR) içeren multiprotein komplekslerinin oluşumuna öncülük eder (Ogura Y,2006, Dinarello CA,1998). Bu da kaspaz-1 aktivasyonunu takiben, pro IL-1 beta'nın işlenerek aktif ekstrasellüler IL-1 beta oluşumu ile sonuçlanır (Scott AM,2007). Kaspaz-1'in postranslasyonel regülasyonu, inflamazonlar tarafından sıkı şekilde kontrol edilmektedir. İnflamazom yolu, sepsiste inflamatuvar yanıtta katkıda bulunmaktadır (Scott AM,2007).

IL-1 reseptör bağlantılı kinaz yolağı, doğuştan gelen immün cevap sırasında NF-kB'yi aktive eder. NF-kB, inflamasyon, hücre sağkalımı ve proliferasyonda öncül rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür ve özellikle proinflamatuvar özellik gösteren birçok genin transkripsiyonu ile bağlantılıdır (Wesche H,1997, Pahl HL,1999). NF-kB, uyarılmamış hücrelerde IκB tarafından sitoplazmada baskılanmış halde bulunur. Sitokinler, virüsler ve lipopolisakkaritler (LPS) gibi NF-kB aktive edici bir uyarı ile beraber IκB'lerin proteozom aracılı yıkımı gerçekleşir. IκB'lerin ayrılması ile serbest kalan NLS, NF-kB'nin nükleusa transferine ve NF-kB motifi taşıyan genlerin transkripsiyonuna neden olur. NF-kB sinyalindeki bozuklukların, inflamasyona neden olan immünsupresyona yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle NF-kB aktivasyonunun inhibe edilmesinin sepsiste azalmış inflamatuvar yanıtı neden olabileceği önerilmiştir.

Fosfoinositol-3 kinaz (PI3K), sinyal iletilici bir enzimdir ve serin/treonin kinazın akış aşağı aktivasyonu, Akt aktivasyonu, inflamatuvar cevap, kemotaksis ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Cantley LC,2002). PI3K, TLR sinyalinin hem negatif hem de pozitif regülatörü olarak iş görebilmektedir. PI3K, TLR'nin pozitif regülatörü olarak, p38 ve ERK 1/2 mitojen-aktif fosfokinazlar ile birlikte proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 beta, IL-6 ve IL-8 üretimini sağlamaktadır (Ojaniemi M,2003 ve Guillot L,2005). Daha detaylı şekilde, PI3K aktivasyonu monositlerde bu mediyatörler için anlamlı bir şekilde promote edici işlev görürken; nötrofillerde bu sitokinlerin oluşumu için LPS cevabını kısıtladığı düşünülmektedir (Wrann CD,2007). Diğer taraftan PI3K/Akt sinyal yolağının, monositlerde endotoksin cevabında olduğu gibi, proinflamatuvar ve apoptotik olayları baskılayan bir endojen negatif feed-back mekanizması olarak da işlev görmesi PI3K/Akt yolağı aktivasyonunun sepsisin ileri evrelerinde sağkalım avantajı sağlayabileceğini düşündürmektedir (Guha M,2002). Rho ailesinden küçük GTPaz'lar, aktin iskeletinin remodellenmesini kontrol ederek hücre hareketliliğinin en önemli düzenleyicilerinden biri olarak iş görürler. RhoA, Rac1 ve Cdc42, bu ailenin iyi bilinen üyeleri olarak, patojen tanıma gibi doğuştan gelen immün yanıtları kontrol eden moleküler anahtarlar olarak iş görürler (Hall A,1998). Bu GTPazlar, fagosit fonksiyonunda migrasyon, kemotaksi ve optimal bakteri öldürme gibi özgün ya da birbiri ile örtüşen rollere sahiptir (Ruse M,2006). PAMP'ların TLR'ler (TLR-2, -4, -3 ve -9) aracılığı ile GTPaz'ları kullandığı ve TLR-2 stimülasyonunu takiben PI3K aktivasyonu için Rac1 aktivasyonunun gerekliliği gösterilmiştir (Arbibe L,2000) (Şekil 2-24).



Şekil 2-24: toll like reseptörlerin uyarılması

2.7.7. TLR Aracılı Sinyalizasyon

TLR aracılı sinyalizasyonda, myeloid differensiyasyon faktör 88'e (MyD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere 2 yol tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarında başlıca dört adaptör molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP). MyD88, TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Ligandın bağlanması ile uyarılan TLR'nin TIR bölgesi MyD88 ile birleşir. Bu birleşmeyle uyarılan IL-1R ilişkili kinaz 4 (IRAK 4) ve tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF 6) aracılığıyla NFkB, mitojenle ilişkili protein kinazı (MAPK) aktive eder ve inflamatuvar cevaba neden olur(Akira S,2004). MyD88 bağımsız sinyal yolu ise başlıca TLR 3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR 3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3'ü uyarak tip 1 interferon cevabına neden olur iken, TLR 4 TRAM üzerinden TRIF'ı uyarak bu cevaba neden olur(O'Neill LAJ,2007). Ayrıca TLR 7, 8 ve 9'un TRAF3 ve IRF7 üzerinden tip 1 interferon cevabı geliştirdiği gösterilmiştir. MyD88 ve TIRAP proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10), TRIF ve TRAM ise interferonların yapımından sorumludur (Şekil)(Yamamoto M, 2003).

2.7.8. TLR ve Kanser ilişkisi

TLR'lerin kanser, diyabet, ateroskleroz, renal hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, respiratuvar hastalıklar, santral sinir sistemi hastalıkları ve otoimmün hastalıklar gibi geniş bir hastalık grubuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Kronik inflamatuvar hastalıkların TLR sinyal yoluyla kanser gelişiminde katkısı olduğu ortaya konmuştur (Li Q,2005). Yapılan labaratuvar çalışmalarında farklı kanser hücre tiplerinde TLR ekspresyonunun artmış olduğu tabloda görülmüştür (Tablo 2-5).

Reseptör	Kanser tipleri
TLR-2	Kolon kanseri(Yoshioka T,2001), Mide kanseri(Chang YJ,2004)
TLR-3	Meme kanseri(Salaun B,2007), Kolon kanseri(Furrie E,2005), Melanoma(Salaun B,2007)
TLR-4	Kolon kanseri(Furrie E,2005), Melanoma(Molteni M,2006), Mide kanseri (Schmausser B,2005), Akciğer kanseri(He W,2007), Hepatoselluler kanser(Seki E,2008), Over kanseri(Kelly MG,2006)
TLR-5	Mide kanseri(Schmausser B,2005), Servikal squamoz hücreli kanser(Kim WY,2008)
TLR-7	Kronik lenfositik lösemi(Koski GK,2005)
TLR-9	Meme kanseri(Merrell MA,2006), Mide kanseri(Schmausser B,2005), Hepatoselluler kanser(Xu N,2008),Servikal squamoz hücreli kanser(Merrell MA,2006), Glioma(El Andaloussi A,2006),Prostat kanseri(Ilvesaro JM,2007)

Tablo 2-5: Tümörlerle ilişkili TLR tipleri

Knockout farelerle yapılan inflamasyonla ilişkili kanser modellerinde, TLR veya TLR adaptör molekülleri eksikliğinde kanser hücrelerinin sayısının, büyüklüğünün ve displazinin(anormal doku büyümesi) azaldığı gözlenmiştir(Fukata M,2007). İnflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli endojen TLR ligandları, prekanseröz hücrelerdeki TLR sinyal yolunu aktive ederek sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, anjiogenik faktörlerin ve ekstrasellüler matriksi yıkan proteazların açığa çıkmasını sağlar(Pikarsky E,2004 ve Greten FR,2004). Böylece kanser gelişimini ve kanserin ilerlemesini destekleyen mikro çevresel şartları oluşturur. Hem onkogenleri hem de tümör baskılayıcıları posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden mikroRNA'lar ile TLR arasındaki ilişki de kanser oluşumunda önemlidir(Berrak G,2012). Çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu

artan mikroRNA'ların TLR 2, 3, 4 ve 9 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Taganov KD, 2006). TLR'nin NF- κ B'ı uyarması sonucu antiapoptotik protein düzeylerinde artma, proapoptotik protein düzeylerinde azalma belirlenmiştir (Nakanishi C, 2005 ve Kreuz S, 2004). Bu etki sonucunda oluşan kanser hücrelerinin artan yaşam süreleri, kemoterapi tedavisine direnç gelişmesine ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunur.

2.7.9. TLR Polimorfizmi

TLR'de mutasyonlar ya da TLR gen polimorfizmi, konağı çeşitli enfeksiyonlara yatkın hale getirir (Underhill DM). Her bir TLR'de amino asit sıralarındaki değişikliklere bağlı olarak iki tane anlamlı tek nukleotid polimorfizmi bulunmuştur (Rifkin IR). TLR2 için ilk mutasyon, R753Q, reseptörün intraselüler kısmındadır, bu mutasyon S.aureus enfeksiyonlarıyla ilişkilidir (Rifkin IR, Schröder NWJ). İkinci mutasyon, R677W, intraselüler mikobakteriyel iletimle ilişkilidir ve bu mutasyon lepramatöz lepra gelişiminde rol oynar (Rifkin IR, Lorenz E). TLR4 için D299G ve T399I mutasyonları tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ekstrasellüler kısımda olup, gram (-) ajanlarla septik sok gelişen hastalarda tespit edilmiştir (Rifkin IR, Kang TJ). TLR4 polimorfizmi, LPS'lere karşı oluşturulan immün yanıtın azalmasına neden olmuştur (Lorenz E).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Çalışmada kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı'nda Glioma teşhisi konulmuş 120 hastalık bir grup ile hastalarla benzer yaşta, beyin fonksiyonları normal olan sağlıklı 225 kişilik kontrol grubunda gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil olan bireylerden 06/2016 ile 09/2016 tarihleri arasında periferik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplandı. EDTA'lı tüp ile alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan gen polimorfizmlerinin genotipleme yapıldı. Çalışmanın deneysel aşaması İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'de gerçekleştirildi.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı masaüstü minisantrifüj (Hettich Zentrifugen - Mikro 120)
- Vortex (Velp Scientifica)
- Güç kaynağı (Thermo Electron Corporation EC 250-90)
- Hassas Terazî (CHYO)
- Santrifüj aleti (Hettich Zentrifügen Rotina 46R)
- pH metre (Microprocessor pH meter WTW)
- Termal Döngü Cihazı (PCR)
- Etüv (37°C Memmert)
- Derin Dondurucu (-20 °C) (Bosch)
- Buzdolabı (+4 °C) (Bosch)
- Otoklav (Nüve)
- Distile Su Cihazı (Millipore Direct-Q 3-system)
- Pipet seti (PİPETMAN- 0,1-1000 mikrolitre)
- Muhtelif cam eşya
- Isıtmalı Karıştırıcı (JAKE&KUNKEL İKA labortechnik)
- Çeker ocak (Termal Laboratuvar Aletleri)

- Elektroforez tankı (Thermo Scientific Easycast B1 A)
- Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi (SYNGENE)
- Parafilm
- Pudrasız Eldiven
- Otomatik Mikropipetler (Eppendorf)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Roche DNA izolasyon kiti "
- Primer sentezleri
- dATP (deoksiadenozin tri-fosfat) (Fermentas)
- dCTP (deoksisitozin tri-fosfat) (Fermentas)
- dGTP (deoksiguanin tri-fosfat) (Fermentas)
- dTTP (deoksitimidin tri-fosfat) (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher)
- PZR Buffer (Magnezyumsuz) (Thermo Fisher)
- Magnezyum Klörür (Thermo Fisher)
- PflMI (Van91I) kesim enzimi ve tamponu (Thermo)
- HinfI kesim enzimi ve tamponu (BioLabs)
- Msp I kesim enzimi ve tamponu (BioLabs)
- NcoI kesim enzimi ve tamponu (BioLabs)
- Agaroz (AppliChem, Almanya)
- EtBr (Sigma)
- EDTA (Etilendi amintetraasetikasit), Proteinaz K (Roche)
- Borik asit (Merck)
- NaCl (Sodyum klorür)
- 50 b.ç'lik Moleküler ağırlık belirteci (Fermentas)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1. Nükleotid Karışımı

Nükleotid karışımı, her birinin derişimi 100mM olan dört ayrı nükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ana stoktan her biri için son derişim 12,5 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4.2. Primer Stok Çözeltisi

Herdef bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri aşağıda belirtildiği gibidir (Tablo 3-1).

Polimorfizm	Primer adı	Primer dizisi	PZR ürün boyu (bç)	RFLP fragment
				RFLP
TLR-4(299)	Primer F Primer R	5'-CCCTATGAACTTTATCCAACC-3' 5'-CAAGCCATTTCAGTATGATC-3'	226	249
NF-κB1 -94 ins/del ATTG	Primer F Primer R	5'-TGGGCACAAGTCGTTTATGC-3' 5'-CTGGAGCCCGTAGGGAAG-3'	240	281
TLR-4(399)	Primer F Primer F	5'-GTGAGTGTGACTATTGAAAGG-3' 5'-CTGGTGTGAGTATGAGAAATG-3'	365	385
TLR-2(753)	Primer R	5'-AAGTTGTGTCTTCATAAGCG-3' 5'-TTATAAAACAGCACCCCAAGA-3'	93	111

Tablo 3-1: primer dizileri

3.1.4.3. 5 x TBE tamponu

54 gr Tris base, 27,5 gr Borik Asit, 20 mL (0,5M; pH: 8.0) EDTA distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH'ı 7,6 olmak üzere ayarlandı.

3.1.4.4. 0,5 x TBE tamponu

50 mL 5 x TBE çözeltisi 450 mL distile su eklenip 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.5. Etidyum Bromid (EtBr) (10mg/ml)

10 mikrogram etidyum bromid 990 mL dH₂O ile 1 mL'ye tamamlandı. Konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanır.

3.1.4.6. % 2 Agaroz Jel Çözeltisi

0,6 gr agaroz, 30 mL 0,5 x TBE (5 x TBE 1/10 oranında sulandırılmıştır) içinde kaynatılıp çözüldükten sonra 0,5 [xl etidyum bromür ilave edildi.

3.1.4.7. % 3 Agaroz Jel Çözeltisi

0,9.gr agaroz, 30 mL 0,5 x TBE (5 x TBE 1/10 oranında sulandırılmıştır) içinde kaynatılıp çözüldükten sonra 0,5 [xl etidyum bromür ilave edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

Vakumlu steril EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri çalışma gününe kadar +4°C'de saklanarak DNA'ları izole edildi.

Çalışmamızda DNA izolasyonu için Roche DNA kiti kullanılmıştır.

1. 1.5mL ependorf tüplere 300 µL kan, 200 µL Binding Buffer ve 40 µL Proteinaz K eklendi. Elde edilen karışım vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra su banyosunda 72 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon sonunda ependorf tüplerdeki karışımın üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve tekrar vorteks yardımıyla karıştırıldı.
3. Filtreli toplama tüpleri hazırlandı ve filtre üzerine ependorftaki karışım eklenerek 9000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Filtreli toplama tüpleri santrifüjden dikkatlice alınarak altındaki tüpler boş tüplerle değiştirildi.
5. Filtreli tüplerine üzerine 500 µL Inhibitor Removal Buffer eklendi ve 9000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüjden alınan toplama tüplerinin altındaki tüpler tekrar değiştirildi ve filtrelerin üzerine 500 µL Wash Buffer eklendi. 9000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki kez uygulandı.
7. Filtreli tüpler santrifüjden çıkartılarak 1,5 mL' lik ependorf tüplerinin üzerine yerleştirildi ve üzerine 200 µL Elution Buffer eklendi. 9000 rpm' de 1

dakika santrifüj edildi.

8. Santrifüj işleminden sonra filtre atılarak ependorfta kalan DNA - 20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.3. DNA Saflığının ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile ölçümler yapılmıştır. DNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik dansitesinden (OD), saflığı 260 nm / 280 nm' deki OD oranından tespit edildi.

Çalışmada, 260 nm / 280 nm'deki OD oranı: $1,5 \pm 0,5$ olan DNA' lar kullanıldı.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bir haploid hücre içerisinde insan genomik DNA' sini oluşturan yaklaşık 3.000.000.000 baz çifti vardır. Saflaştırılmış DNA'dan özel bir kısmı çoğaltmak için her biri 0,000.000.000.01 mol olan primerler PZR reaksiyonuna eklenir. Yaklaşık 30 döngü sonrasında yaklaşık 1.000.000.000 üzerinde ilgili genin ve/veya genlerin kopyası üretilebilir (Stephenson 2010). Polimeraz zincir reaksiyonu PZR (Polymerase Chain Reaction; PCR), belirli nükleik asit kısımlarının çoğaltılmasıdır. Tipik bir PZR için nükleik asit (DNA veya RNA), termal olarak kararlı DNA polimeraz, dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP), magnezyum, oligonükleotid, primerler ve buffer gereklidir. Çoğalma üç evrede gerçekleşir: (1) Denatürasyon evresi, nükleik asitin yüksek sıcaklığa (92-98°C) maruz kalarak tek zincirli hale gelmesidir. (2) Annealing (bağlanma) evresi, sıcaklık 65 -72°C arasına geldiği zaman tek zincirli DNA' nın 3' ucuna primerlerin bağlanması gerçekleşir. (3) Extension (uzama) olarak adlandırılan son aşama, DNA polimeraz bağlanan primerlerin 3' uçlarına dNTP'leri ekleyerek uzamasını sağlar (Stephenson 2010; Nussbaum ve ark. 2005 p.44). Bir döngüyü oluşturan bu işlemler tekrarlanır. Uygulamaya bağlı olarak 25-40 döngü yapılarak PZR ürünleri elde edilir (Stephenson 2010).

Genetik hastalıkların teşhisi, mikroorganizmalar ile kontamine olmuş gıdaların belirlenmesi, belirli kromozom bölümleri için gen haritalama vs. için kullanılmaktadır (Stephenson 2010).

İnsan genomundaki tek bir baz çiftindeki varyasyona "tek nükleotid

polimorfizmleri (SNPs)” denir. Bu polimorfizmler ortalama 1000 baz çiftinde bir kez ortaya çıkar (Campbell ve Reece 2008 p.392). Restriksiyon fragment analizi ile bu varyasyonlar saptanabilmektedir. PZR ile elde edilen DNA, restriksiyon enzimleriyle muamele sonucunda jel elektroforezinde DNA fragmentleri büyüklüklerine göre ayrılarak SNP’ ler tespit edilmektedir (Campbell ve Reece 2008 p.386).

3.2.5. PZR Reaksiyon Karışımı

3.2.5.1. *NFKB1* -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı

NFKB1 gen polimorfizminin tespiti için 20 µl reaksiyon hacminde 0,2 ml’lik PZR tüplerinde PZR karışımı hazırlandı. *NFKB1* -94 ins/del ATTG gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde ekzondaki insersion delesyon değişimi analizi için PZR-RFLP tekniği kullanıldı. RFLP için PflMI (10 000 units/ml) kesim enziminden 3 unit alınarak PZR ürünü kesilmiştir. Kullanılan PZR koşulları Tablo ’ da verilmiştir.

PZR reaksiyonu, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cyler’ da Tablo 3-2’ daki program uygulanarak gerçekleştirildi.

Malzeme	Miktar
10 x PZR tamponu	2 µL
MgCl ₂ (25mM) (Thermo Fisher)	2 µL
Primer	1 µL
dNTP(0.5mM) (Fermantas)	2 µL
Taq DNA polimeraz enzimi (5u/pL) (Thermo Fisher)	0,3 µL
Genomik DNA	5 µL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 20 µL’ ye tamamlandı.	

Tablo 3-2: *NFKB1* - 94 ins/del ATTG polimorfizmi için PZR karışımı

PZR reaksiyonu, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler' da Tablo 3-3 ' deki program uygulanarak gerçekleştirildi.

Denatürasyon	Bağlanma	Uzama
95 °C 5 dk	95 °C 30 sn 60 °C 30 sn 72 °C 1 dk 35 Döngü	72 °C 5 dk

Tablo 3-3: *NFKB1* - 94 ins/del ATTG polimorfizmi için PZR programı

3.2.5.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı

TLR-2 Arg753Gln gen polimorfizminin tespiti için 20 µl reaksiyon hacminde 0,2 ml'lik PZR tüplerinde PZR karışımı hazırlandı. TLR-2 Arg753Gln gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde ekzondaki amino asit değişimi analizi için PZR-RFLP tekniği kullanıldı. RFLP için Msp I (10 000 units/ml) kesim enziminden 3 unit alınarak PZR ürünü kesilmiştir. Kullanılan PZR koşulları Tablo 3-4' da verilmiştir.

Malzeme	Miktar
5 x PZR tamponu(flexi buffer)	5 µL
d H ₂ O	12,475 µL
MgCl ₂ (25mM) (Thermo Fisher)	1,5µL
Primer	1 µL
dNTP(0.5mM) (Fermantas)	0,5 µL
Taq DNA polimeraz enzimi (5u/pL) (Thermo Fisher)	0,125 µL
Genomik DNA	3 µL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 25 µL' ye tamamlandı.	

Tablo 3-4: TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi için PZR karışımı

PZR reaksiyonu, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da Tablo 3-5 'deki program uygulanarak gerçekleştirildi.

Denatürasyon	Bağlanma	Uzama
95 °C 2 dk	94 °C 30 sn	72 °C 3 dk
	58 °C 45 sn	4°C ∞
	72 °C 45 sn	
	35 Döngü	

Tablo 3-5: TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi için PZR programı

3.2.5.3. TLR-4 Asp299G1y Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı

TLR-4 Asp299G1y gen polimorfizminin tespiti için 20 µL reaksiyon hacminde 0,2 ml'lik PZR tüplerinde PZR karışımı hazırlandı. TLR-4 Asp299G1y gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde ekzondaki amino asit değişimi analizi için PZR-RFLP tekniği kullanıldı. RFLP için Nco I (10 000 units/ml) kesim enziminden 3 unit alınarak PZR ürünü kesilmiştir. Kullanılan PZR koşulları Tablo 3-6 ' da verilmiştir.

Malzeme	Miktar
5 x PZR tamponu(flexi buffer)	5 µL
d H ₂ O	11,975 µL
MgCl ₂ (25mM) (Thermo Fisher)	2µL
Primer	1 µL
dNTP(0.5mM) (Fermantas)	0,5 µL
Taq DNA polimeraz enzimi (5u/pL) (Thermo Fisher)	0,125 µL
Genomik DNA	3 µL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 25 µL' ye tamamlandı.	

Tablo 3-6: TLR-4 Asp299G1y polimorfizmi için PZR karışımı

PZR reaksiyonu, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da Tablo 3-7'deki program uygulanarak gerçekleştirildi.

Denatürasyon	Bağlanma	Uzama
95 °C 2 dk	94 °C 30 sn	72 °C 3 dk
	53 °C 45 sn	4°C ∞
	72 °C 45 sn	
	35 Döngü	

Tablo 3-7: TLR-4 Asp299G1y polimorfizmi için PZR programı

3.2.5.4. TLR-4 Thr399Ile Polimorfizmi için PZR Reaksiyon Karışımı

TLR-4 Thr399Ile gen polimorfizminin tespiti için 20 µL reaksiyon hacminde 0,2 ml'lik PZR tüplerinde PZR karışımı hazırlandı. TLR-4 Thr399Ile gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde ekzondaki amino asit değişimi analizi için PZR-RFLP tekniği kullanıldı. RFLP için Hinf I (10 000 units/ml) kesim enziminden 3 unit alınarak PZR ürünü kesilmiştir. Kullanılan PZR koşulları Tablo 3-8 ' da verilmiştir.

Malzeme	Miktar
5 x PZR tamponu(flexi buffer)	5 µL
d H ₂ O	11,975 µL
MgCl ₂ (25mM) (Thermo Fisher)	2µL
Primer	1 µL
dNTP(0.5mM) (Fermantas)	0,5 µL
Taq DNA polimeraz enzimi (5u/pL) (Thermo Fisher)	0,125 µL
Genomik DNA	3 µL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 25 µL' ye tamamlandı.	

Tablo 3-8 : TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi için PZR karışımı

PZR reaksiyonu, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cyclers’da Tablo 3-9 ’deki program uygulanarak gerçekleştirildi.

Denatürasyon	Bağlanma	Uzama
96 °C 2 dk	94 °C 30 sn 56 °C 45 sn 72 °C 45 sn 35 Döngü	72 °C 3 dk 4°C ∞

Tablo 3-9: TLR-4 Thr399İle polimorfizmi için PZR programı

3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçalarının ayrılması ve tanımlanması için standart bir metod olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Jeldeki DNA bantları, jelin bir floresans boya olan etidyum bromür ile boyanması ve jelin UV ışık altında incelenmesi ile belirlenir.

3.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Elde edilen PZR ürününün olup olmadığını değerlendirmek için % 2’lik agaroz jel hazırlandı. 0,6 gram agaroz (A 5093, Sigma), 30 ml TBE (Tris, Borik asit ve EDTA) tamponu ile bir beherde karıştırıldı. Agaroz, TBE içinde ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı yardımıyla eritilip kaynatıldı. Agaroz çözeltisi 50-60 °C’ye soğutulduktan sonra çeker ocak altında 1 µL EtBr (10mg/ml Ethidium bromür) ilave edildi. Jelde kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi ve jelin donması için bekletildi. Jel kabı 0,5 X TBE tamponu içeren yatay elektroforez tankına kuyular negatif kutba doğru olarak yerleştirildi.

3.3.2. PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

NFKB1 ,TLR-4 Asp299Gly, TLR-4 Thr399Ile ve TLR-2 Arg753Gln 'nın elde edilen PZR ürününden 5 µL yükleme boyası (6x Loading Dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel sırasıyla sırasıyla ; *NFKB1* için 45 dk ve 90 voltluk , TLR-4 Asp299Gly için 40 dk 120 voltluk, TLR-4 Thr399Ile için 93 dk 90 voltta ve TLR-2 Arg753Gln 50 dk 90 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 50 bp'lik belirteç (ladder) kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda;

NFKB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmine ait 281/285 bp büyüklüğünde PZR ürünü,

TLR-4 Asp299Gly polimorfizmine ait 468 bp büyüklüğünde PZR ürünü

TLR-4 Thr399Ile polimorfizmine ait 385 bp büyüklüğünde PZR ürünü

TLR-2 Arg753Gln polimorfizmine ait 111 bp büyüklüğünde PZR ürünü görüldü.

3.3.4. Restriksiyon Enzim Kesimi

3.3.4.1. *NFKB1* -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi

Elektro forez değerlendirmesi sonucunda geriye kalan 15 µL 'lik PZR ürününden 5 µL alınarak restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimi için 10 µL lik karışım hazırlandı. 10 µL'lik karışım Tablo 3-10'dadır.

Restriksiyon Enzimi (PfiMI - Van91I) (10 Ünite/pL, Fermentas)	0,3 µL
Restriksiyon Enzim Buffer	2 µL
PCR Ürünü	5 µL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 10 µL' ye tamamlandı.	

Tablo 3-10: *NFKB1* - 94 ins/del ATTG polimorfizmi için restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon koşulları

10 µL toplam hacimli kesim karışımı su banyosunda 37°C’ de 1-4 saat bekletildi. Bekleme süresinde %3’lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 30 dakika 90 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 50 bp’lık ladder kullanıldı. UV illüminator altında değerlendirildi.

ATTG insersiyonuna sahip allel, genin promotöründe 2 adet ATTG (ATTG2; ins) dizisi taşımaktadır. Bu durum, bir *PfLMI* kesim yeri (5’.. .CCANNNN jNTGG.. .3’) oluşumuna yol açar. Restriksiyon sindirimi sonucunda ATTG insersiyonuna sahip allellerde (ATTG₂) 45 ve 240 bp büyüklüğünde 2 parça oluşur. ATTG₁ (del) allelinde kesim gerçekleşmez.

3.3.4.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi

Elektro forez değerlendirmesi sonucunda geriye kalan 15 µL ’lik PZR ürününden 2 µL alınarak restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimi için 10.5 µL lik karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımın içeriği Tablo 3-11’dadır.

Restriksiyon Enzimi (Msp I) (10 Ünite/pL, BioLabs)	0,25 µL
Restriksiyon Enzim Buffer	1.25 µL
PCR Ürünü	2 µL
Total hacim, distile su kullanılarak 10.5 µL ’ ye tamamlandı.	

Tablo 3-11: TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi için restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon koşulları

10.5 µL toplam hacimli kesim karışımı su banyosunda 37°C’ de 15 dakika ve 65°C’ de 20 dk bekletildi. Bekleme sürecinde %3’lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 40 dakika 90 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 50 bp’lık DNA ladder kullanıldı. UV illuminatör altında değerlendirildi.

3.3.4.3. TLR-4 Asp299G1y Polimorfizmi için Restriksiyon Enzim Kesimi

Elektro forez değerlendirmesi sonucunda geriye kalan 15 μL 'lik PZ1R ürününden 5 μL alınarak restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimi için 10 μL lik karışım hazırlandı. 10 μL 'lik karışım Tablo 3-12'da gösterilmiştir.

Restriksiyon Enzimi (Msp I) (10 Ünite/pL, BioLabs)	0,5 μL
Restriksiyon Enzim Buffer	2 μL
PCR Ürünü	5 μL
Total hacim, bidistile su kullanılarak 10 μL ' ye tamamlandı.	

Tablo 3-12: TLR-4 Asp299G1y polimorfizmi için restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon koşulları

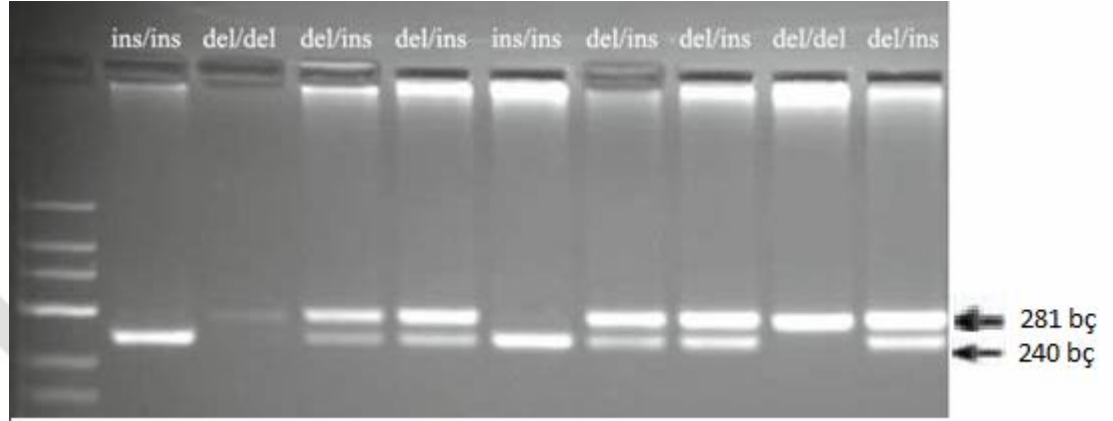
10 μL toplam hacimli kesim karışımı su banyosunda 37°C' de bir gece ve bekletildi. İşlem sonrasında %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 40 dakika 90 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 50 bp'lık DNA ladder kullanıldı. UV illüminator altında değerlendirildi.

TLR-4 Asp299G1y polimorfizmi genotipleri için agaroz jel görüntüleri Tablo' da gösterilmektedir.

4. Bulgular

4.1. *NFKB1* -94 ins/del ATTG Polimorfizmi için Genotip Tayini

NFKB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi genotipleri için agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4-1 'de gösterilmektedir.

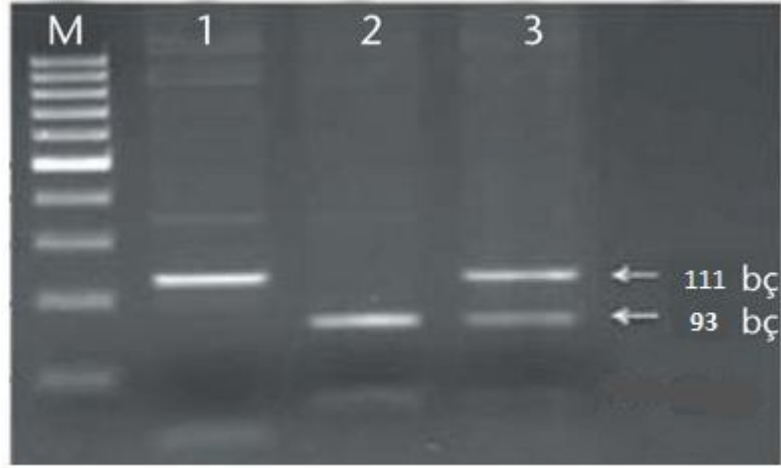


Şekil 4-1 : *NFKB1* -94 ins/del ATTG polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü (100bç marker)

281 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde del/del homozigot varyant, 240+281+45 bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde del/ins heterozigot varyant ve 240+45 bç büyüklüğündeki bant görüldüğünde ise ins/ins homozigot yabanil tip genotipler olarak değerlendirildi.

4.2. TLR-2 Arg753Gln Polimorfizmi için Genotip Tayini

TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi genotipleri için agaroz jel görüntüleri Şekil 4-2 'de gösterilmektedir.

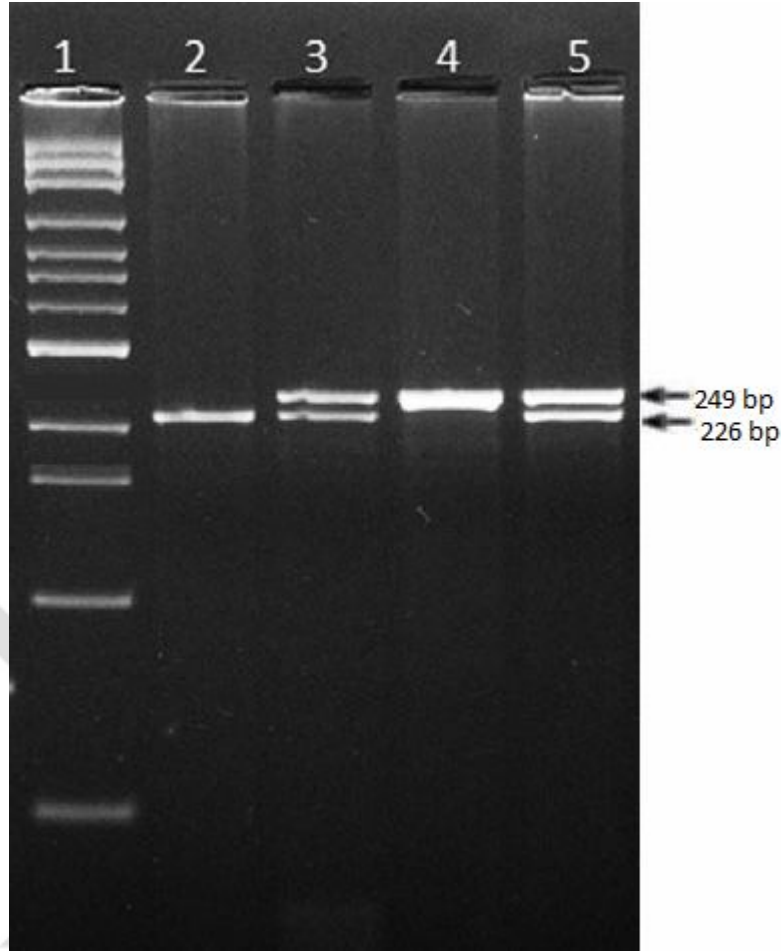


Şekil 4-2: TLR-2 Arg753Gln polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü

111 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde Arg/Arg (AA) homozigot yabanil tip, 111+93 bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde Arg/Gln (AG) heterozigot varyant ve 93 bç büyüklüğündeki bant görüldüğünde ise Gln/Gln (GG) homozigot varyant genotipler olarak değerlendirildi.

4.3. TLR-4 Asp299Gly Polimorfizmi için Genotip Tayini

TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi genotipleri için agaroz jel görüntüleri Şekil 4-3 ' de gösterilmektedir.

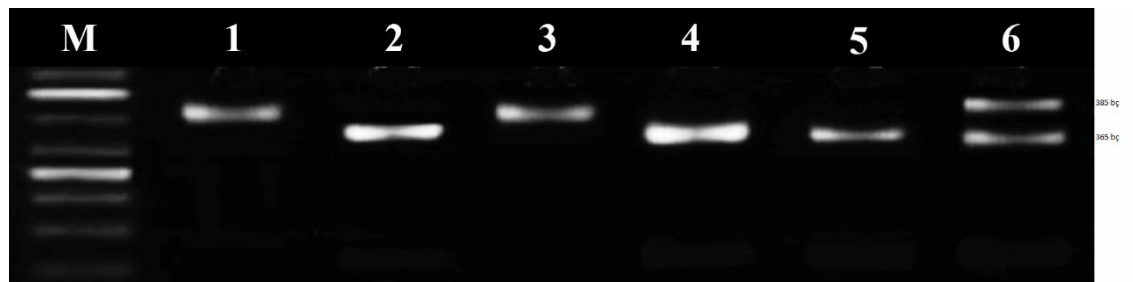


Şekil 4-3: TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü

249 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde Asp/Asp (AA) homozigot yabanil tip, 249+226 bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde Asp/Gly (AG) heterozigot varyant ve 226 bç büyüklüğündeki bant görüldüğünde ise Gly/Gly (GG) homozigot varyant genotipler olarak değerlendirildi.

4.4. TLR-4 Thr399Ile Polimorfizmi için Genotip Tayini

TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi genotipleri için agaroz jel görüntüleri Şekil 4-4 ' de gösterilmektedir.



Şekil 4-4: TLR-4 Thr399Ile polimorfizminin genotipleri için agaroz jel görüntüsü

385 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde Thr/Thr (CC) homozigot yabancı tip, 385+365+20 bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde Thr/Ile (CT) heterozigot varyant ve 365+20 (Ile/Ile) bç büyüklüğündeki bant görüldüğünde ise Ile/Ile (TT) homozigot varyant genotipler olarak değerlendirildi.

4.5. Bulguların Analizi

4.5.1. İstatistiksel Sonuçlar

Hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel sıklığı dağılımları Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Genotip	Hasta (n=120)	Kontrol (n=225)	OR(%95CI)	P
NF-kB1				
ins/ins	48	54	Ref.	Ref.
ins/del	63	149	2,10 (1,29-3,42)	0,003
del/del	9	22	2,17 (0,91-5,17)	0,08
ins allel sıklığı	0,66	0,57		
del allel sıklığı	0,34	0,43	1,46 (0,83-2,59)	0,19
TLR-2 753				
GG	32	184	Ref.	Ref.
GA	18	35	0,34 (0,17-0,67)	0,001
AA	70	6	0,02 (0,01-0,04)	<0,001
G allel sıklığı	0,34	0,90		
A allel sıklığı	0,66	0,10	0,06 (0,03-0,12)	<0,001
TLR-4 299				
AA	120	200	Ref.	Ref.
*AG	0	24		<0,001
*GG	0	1		1,00
A allel sıklığı	1,00	0,94		
*G allel sıklığı	0,00	0,06		1,00
TLR-4 399				
CC	112	210	Ref.	Ref.
CT	8	12	0,8 (0,32-2,02)	0,64
*TT	0	3		0,21
C allel sıklığı	0,96	0,96		
T allel sıklığı	0,04	0,04		1,00

*Fisher's Exact Test (two-sided) , Pearson Chi-square test (two-sided)

Tablo 4-1: Glioma ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel sıklığı dağılımları

- NFKB1 -94 ins/ins genotipi glioma için risk faktörüdür.
- TLR-2 Arg753Gln “GG” genotipi glioma için koruyucudur ,
- TLR-2 Arg753Gln “G” alleli bulunması glioma için koruyucu rol oynamaktadır.
- TLR-4 Asp299G1y “AG” genotipi glioma için koruyucu rol oynamaktadır,
- TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi açısından herhangi bir anlamlı ilişki saptamadık.

Ayrıca, hasta ve kontrol karşılaştırmasında genotiplerin hastalığın riski ya da koruyuculuğu üzerine etkilerini kombine genotip analizi (Tablo 4-2 A, B, ve C) ile de inceledik.

Genotip	Hasta (120)	Kontrol (225)	OR(%95CI)	p
ins/ins+GG	16	46		Ref.
ins/ins+GA	4	11	0,96 (0,27-3,43)	1,00
ins/ins+AA	29	1	0,01 (0,002-0,1)	<0,001
del/ins+GG	14	108	2,68 (1,21-5,95)	0,01
del/ins+GA	13	20	0,54 (0,22-1,32)	0,17
del/ins+AA	36	4	0,04 (0,01-0,13)	<0,001
del/del+GG	3	19	2,2 (0,58-8,45)	0,37
del/del+GA	1	4	1,39 (0,15-13,4)	1,00
del/del+AA	6	2	0,12 (0,02-0,63)	0,01

Ins/ins + GG kombine genotip dağılımı glioma için koruyucu rol oynamaktadır.

Tablo 4-2 A: NF-KB+ TLR-2 Arg753Gln kombine genotip dağılımları

Genotip	Hasta(120)	Kontrol(225)	OR(%95CI)	p
ins/ins+GG	49	53		Ref.
ins/ins+GA	0	3		0,25
ins/ins+AA	0	1		1,00
del/ins+GG	63	121	1,78 (1,08-2,90)	0,02
del/ins+GA	0	16		<0,001
del/ins+AA	0	0		
del/del+GG	10	22	2,03 (0,88-4,72)	0,10
del/del+GA	0	5		0,06
del/del+AA	0	0		

Tablo 4-2 B: NF-KB+ TLR-4 Asp299G1y kombine genotip analizi

Ins/ins + GG genotipi glioma için risk faktörüdür.

del/ins + GA genotipi glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynamaktadır.

Genotip	Hasta(120)	Kontrol(225)	OR(%95CI)	p
ins/ins+CC	46	55		Ref.
ins/ins+CT	3	2	0,56 (0,09-3,48)	0,53
ins/ins+TT	0	0		
del/ins+CC	59	126	1,79 (1,08-2,94)	0,02
del/ins+CT	4	9	1,88 (0,54-6,51)	0,31
del/ins+TT	0	2		0,50
del/del+CC	8	25	2,61 (1,08-6,35)	0,03
del/del+CT	1	1	0,84 (0,05-13,75)	1,00
del/del+TT	0	1		1,00

Tablo 4-2 C: NF-KB+ TLR-4 Thr399İle kombine genotip analizi

Ins/ins + CC genotipi glioma için risk faktörüdür.

4. TARTIŞMA

Beyinden köken alan kanserler primer ve sekonder olarak iki kısma ayrılır. Primer beyin kanserleri beyinde ve az da olsa omurilikte görülmektedir. Sekonder beyin kanserinde ise kanser farklı bir organda başlar ve dolaşım yoluyla beyine ulaşır. İnsanda en fazla görülen MSS kanseri, beyinin destek dokusunda bulunan glial hücrelerden köken alan kanserlerdir.

İnsanlarda 13 çeşit TLR bulunmuştur. TLR ve kanser ile ilgili cesitli calismalar yapılmıştır. Farklı kanser türlerinde ekspresyonu artan mikroRNA'ların TLR 2, 3, 4 ve 9 ile ilişkisi bulunduğu görülmüştür (Taganov KD, 2006). TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 gastro intestinal kanserlerde TNM (tümör lenf nodu metastazı) ile ilişkilidir. TLR-2, TLR-4 ve TLR-9 aktif formları gastrointestinal kanser hücrelerinde invazyona neden olurlar (Heikki H. ,2016). Bağırsak epitel hücrelerinde TLR-2 / MyD88 sinyali, hasar görmüş mukozadaki kök hücre havuzunun genişlemesinde kritik bir rol oynamaktadır ve fare modellerinde tümör büyümesi için gereklidir. TLR2 insan ve fare modellerinde mide tümörlerinde en fazla düzenlenen TLR'dir ve ekspresyonu çoğunlukla tümör epitel hücrelerinde tespit edilir (Kanae E., 2016).

TLR4 geninde meydana gelen dizi değişiklikleri bu reseptörün hücre membranına tasinimini bozabilir (Davoodi 2012). Polimorfik TLR4 reseptörünün diğer olası etkileri azalmış ligand bağlama kapasitesi ve reseptör konformasyonundaki değişikliklerdir. Bu değişiklikler sinyal iletimini bozabilir (Davoodi 2012, Lorenz E 2002 ve Ferwerda B 2008). TLR4 genindeki iki yaygın SNP, Asp299Gly ve Thr399Ile, liganda karşı düşük cevap ile ilişkilidir (Davoodi 2012 ve Apetoh L 2008). Biz calismamizda TLR4 Asp299Gly, TLR4 Thr399Ile ve TLR2 Arg573Gln polimorfizmleri ile glioma riski arasındaki ilişkiyi araştırdık. TLR-4 299 AG genotipi ile azalmış glioma riski arasında anlamlı bir ilişki saptadık ($p<0,001$). TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi açısından herhangi bir anlamlılık saptanmadı. Bu bulgulara ek olarak, TLR-2 753 GG genotipinin glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynadığını bulduk ($p=0,001$). Ayrıca, TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi için A allelinin glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynadığını gösterdik ($p<0,001$).

Huang ve arkadaşları, TLR-2'nin susturulmasının hepatokarsinoma için olası bir shRNA tabanlı gen terapisi olabileceğini düşünüyorlardı ve siRNA ile inhibe edilen

TLR-2'nin sitokin IL-6 ve IL-8 salınımını azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca, bu araştırma grubu TLR2 RNAi uygulanan farelerde tumor hacminde azalma olduğunu göstermişlerdir (Ming S. 2016 ve Huang Y 2012).

NF- κ B, Rel ailesinin beş üyesinden bir veya ikisini içeren bir homo- veya hetero-dimerik transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B, proliferasyonu ve hücre sağkalımını ileten c-IAP1, C-IAP2, XIAP, Bcl-XL, Bfl-1 / A1 ve p53 gibi genleri aktive eder. Bu nedenle NF- κ B'nin Hodgkin hastalığı, akut lenfoblastik lösemi, göğüs kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, karaciğer kanseri ve melanoma gibi çeşitli kanserlerde yapısal olarak aktive olması şaşırtıcı değildir (Qiutang L. 2005). Cesitli araştırmacılar Pikarsky ve diğerleri, Luo ve ark. Ve Greten ve ark. NF- κ B'nin tümör hücreleri ve tümör ilişkili inflamatuvar hücreler üzerine etki ederek tumor gelişimine katkıda bulunduklarını göstermişlerdir (Qiutang L. 2005 ve Pikarsky, E 2004 ve Luo, J 2004 ve Greten, F 2004).

NF-KB nin kanser ile olası ilişkisi göz önüne alındığında, çalışmamızda NFKB -94 Ins/del polimorfizmi ile glioma arasındaki ilişkiyi inceledik. NFKB1 -94 ins/ins genotipinin glioma için risk faktörü olduğunu gördük. Bununla beraber NF-KB “ins/ins” ve TLR-2 Arg753Gln “GG” kombine genotipi glioma için koruyucu rol oynamaktadır. Ayrıca, NF-KB “del/ins” ve TLR-4 Asp299Gly “GA” kombine genotipi glioma gelişimine karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bu bulgulara ek olarak, NF-KB+ TLR-4 Thr399Ile kombine genotip analizinde “ins/ins” genotipi “CC” genotipiyle bir araya gelince glioma için risk faktörü oluşturmaktadır. NF- κ B sinyal yolu tümör mikrocevresini artırarak kansere katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (Mengchu Z.2016). Kanser tedavisinde birçok ilaç NF- κ B'yi hedef almaktadır. Bununla birlikte, daha yeni kanıtlar, NF κ B'nin tümör büyümesini de engelleyebildiğini göstermektedir (Xue X. 2016). Transkripsiyon faktörü NF- κ B doğuştan gelen bağışıklık ve inflamatuvar yanıtlarda önemli bir rol oynamaktadır ve inflamasyon ile tümörigenez arasındaki en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Bu faktör antiapoptotik genleri aktive eder ve prekanseröz ve habis hücrelerin apoptozdan kaçmasını teşvik edebilir (Gustavo Rodrigues M.2016).

Bildigimiz kadarıyla, literatürde glioma ile NF- κ B ve TLR arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışılma bulunmamaktadır. Bununla beraber farklı kanser türleri için çalışmalar yapılmıştır. miR-21 ve miR-29a, immün hücrelerdeki TLR ailesinin reseptörlerine ligand bağlayarak tümör büyümesine ve metastaza yol açan bir TLR

aracılı prometastatik enflamatuvar yanıtı tetikleyebilir (Xiaoxia L. 2016). MSC'lerde TLR-2 baskılanmasının NFκB sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Xiaoxia L. 2016). TLR-2'nin TLR-4 ve TLR-3'den farklı olarak, zararlı sistemik inflamasyon, kardiyak disfonksiyon, akut böbrek hasarı (kritik hastalarda ortak bir varlık) ile ilişkilidir ve çoğunlukla ciddi sepsis ile tetiklenir. İnsanlarda, TLR-2 sinyalizasyonu MyD88 yolağını aktive olur ve bu da NF-κB, interferon (IFN) düzenleyici faktör (IRF) ailesinin üyeleri ve mitojen ile aktive olan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bununla beraber Protein kinaz (MAPK) sinyal yolları, sonuçta inflamasyonlu sitokinler, C reaktif protein (CRP), Pentraxin 3, vb. Üretimine yol açar (Jing Z.2015).

Sonuc olarak, bulgularımız NFκB ve TLR polimorfizmi ile glioma arasında anlamlı bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir. Ancak, bu sonuçların daha büyük vaka-kontrol çalışmalarını ile doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune responses. *Nature* 2000; 406: 782-787.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 2004; 4: 499-511.
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4: 2860-67.
- Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105-8.
- Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 2003;15: 5 11.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, and Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732-738.
- Amersfoort ESV, Van Berkel TJ; Kuiper J. Receptors, mediators, mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003; 16:379-414.
- Andreaskos E, Foxwell B, and Feldmann M. Is targeting Tolllike receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunological Reviews* 2004;202:250-265.
- Andrea J., Hansson I., Afink G.B., Nister M. Platelet Derived Growth Factor Receptor- α in Ventricular Zone Cells and in Developing Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17, 1001-1013, 2001.
- Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985;42:779-89.
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1 dependent pathway. *Nat Immunol* 2000; 1:533-540
- Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biol Res.* 2007;40: 97-112.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of Tolllike receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277(17):15028-34.

- BASARAN A.: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı., Günes&Nobel Kitabevleri, Genisletilmiş 7. Baskı, 2005.
- Baeuerle PA. I κ B-NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 1998; 95: 729-731.
- Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-681.
- Barkett, M., Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene*, 18 (49), 6910-6924.
- Barkett, M., Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18 (49), 6910-6924.
- Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A.F., Delattre J.Y. Primary Brain Tumours in Adults. *Lancet*; 361; 323-331, 2003.
- Berkowitz, B., Huang, D.-B., Chen-Park, F.E., Sigler, P.B., Ghosh, G. (2002) The X-ray crystal structure of the NF- κ B p50·p65 heterodimer bound to the interferon β - κ B site. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (27), 24694-24700. 185
- Berrak G, Murat C et al. Role of Toll Like Receptors in Various Diseases. *Sakarya Medical Journal*.2012.47550
- B.A. Beutler, TLRs and innate immunity, *Blood* 2009;113: 1399–1407.
- Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP et al. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Virology* 2002;76(17):8729-8736.
- Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002;298(5595):1025–1029.
- Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller KH, Jung G, Brock R, Akira S, et al. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *European Journal of Immunology* 2005;35(1):282-289.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*: 2001;167: 416-23.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655–1657
- Cavaliere R., Lopes M. B. S., Schiff D.:Low-grade Gliomas: An Update on Pathology and Therapy. *Lancet Neurol.*, 4: 760-770, 2005.

- C.A. Janeway Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol* 2002;20: 197–216.
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H et al. Induction of cyclooxygenase 2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Molecular pharmacology* 2004;66:1465-77.
- Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, and Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *Journal of Immunology* 2008;181(1):22-26.
- CHINTALA S.K., RAO JASTI S.R.: Invasion of human glioma: Role of extracellular matrix proteins. *Frontiers in Bioscience* 1, d324-339, 1 November 1996.
- Collins V. P. Cellular Mechanisms Targeted During Astrocytoma Progression. *Cancer Letters*. 188; 1-7, 2002.
- COLLINS V.P.: Progression as exemplified by human astrocytic tumors, *Cancer Biology*, Vol 9, 267-276, 1999.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa-B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909.
- COSAN E.: Nörosirurjide Temel Konular ve _lkeler. Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2004.
- David A. Geller, MD University of Pittsburgh Starzl Transplant Institute, NF-kB in transplantation: friend or foe? *Transplant Infectious Disease* 2001; 3:212–219.
- De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:1413-24.
- Ding H., Nagy A., Gutmann D.H., Guha A: A Review of Astrocytoma Models. *Neurosurg. Focus*. 8,4, 2000.
- Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin- 18, and the interleukin-1 converting enzyme. *Ann NY Acad Sci* 1998; 856:1–11
- El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 2006;54:526-35.
- EVA V., THAIS B., ANAIS V. H., GODELIEVE V., GREETJE V. V., ABHISHEK D. G., PATRICIA A., IGNACE V. and AN C. The Use of Toll-like Receptor 4 Agonist

to Reshape the Immune Signature in Ovarian Cancer. *ANTICANCER RESEARCH* 36: 5781-5792(2016) doi:10.21873/anticancer.11162

FALCHETTI A., BECHERINI L., MARTINETTI V., MORELLI A., BENVENUTI S., PICARIELLO L., GENNARI L., LAMPUGNANI R., BORDI C., BRANDI M.L.: Telomerase repeat amplification protocol (TRAP): A new molecular marker for parathyroid carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 252-255, 1999.

Felsberg J., Reifenberger G.: Neuropathology and Molecular Genetics of Diffusely Infiltrating Cerebral Gliomas. *Med. Laser Appl.*, 17: 133-146, 2002.

Fujita, T., Nolan, G.P., Liou, H.C., Scott, M.L., Baltimore, D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF- κ B p50 homodimers. *Genes&Development*, 7, 1354-1363.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1869-81.

Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 2005;115:565-74.

GARTNER L.P., HIATT J.L.: Color Textbook of Histology. W.B. Saunders Company, 1997.

Ghosh, G., Duyne, G.V., Ghosh, S., Sigler, P.B. (1995) Structure of NF-[kappa]B p50 homodimer bound to a [kappa]B site. *Nature*, 373 (6512), 303-310.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and REL proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.

Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25 (51), 6680-6684.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285-96.

- Guha M, Mackman N. The PI3K-Akt pathway limits LPS activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2002; 277:32124–32132
- Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005; 280:5571–5580
- Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, and Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology* 2002;168(12):5989-5992.
- Gustavo Rodrigues Martins, Gabriela Bottaro Gelaleti, Marina Gobbe Moschetta, Larissa Bazela Maschio-Signorini, and Debora Ap. Pires de Campos Zuccari. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF- κ B Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume 2016, Article ID 9512743, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9512743>
- Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279:509–514
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410(6832):1099-1103.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001; 410(6832):1099-103.
- Hayden, M.S., Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132 (3), 344 -362.
- He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 2007;44:2850-9.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303(5663):1526–1529.
- Heikki H., Olli H., Joonas H. K., Tuula S., Katja P., Juha S., Petri P. L., and Tuomo J. K. The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2016, Vol. 64(8) 470–482

- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-745.
- Herfarth K.K., Gutwein S., Debus J.: Post Operative Radiotherapy of Astrocytomas. *Seminars in Surgical Oncology*. 20: 13-23, 2001.
- Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll- like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4743-56.
- Hodgkinson CP, Patel K, and Ye S. Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. *Thrombosis and Haemostasis* 2008;100(2):301-307.
- Holvoet P, Davey PC, De Keyzer D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML et al. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with Toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006;26(7):1558-1565.
- Huang, D.B., Huxford, T., Chen, Y.Q., Ghosh, G. (1997) The role of DNA in the mechanism of NF κ B dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. *Structure*, 5 (11), 1427-1436.
- Huxford, T., Ghosh, G. (2009) A structural guide to proteins of the NF- κ B signaling module. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 1 (a000075), 1-16.
- 20) Perkins, N.D. (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, 25 (51), 6717-6730.
- Huxford, T., Hoffmann, A., Ghosh, G. (2011). Understanding the logic of I κ B:NF- κ B regulation in structural terms. M. Karin (Ed.). *NF- κ B in Health and Disease* (c. 349, s. 1-24): Springer Berlin Heidelberg.
- Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW et al. Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *The Prostate* 2007;67:774-81.
- İnci A, Bişkin Z. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Rollerini Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2007; 4(2):121-128.
- Jana M, Palencia CA, and Pahan K. Fibrillar amyloid- β peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Immunology* 2008;18(10):7254-7262.

- Jing Zhong, Qi-Qing Shi, Min-Min Zhu, Jian Shen, Hui-Hui Wang, Duan Ma, Chang-Hong Miao¹. MFHAS1 Is Associated with Sepsis and Stimulates TLR2/NF- κ B Signaling Pathway Following Negative Regulation. PLoS ONE 10(11): e0143662. doi:10.1371/journal.pone.0143662. November 24, 2015
- Johannesen T.B., Langmark F., Lote K.: Cause of Death and Long-Term Survival in Patients with Neuro-epithelial Brain Tumours: A Population Based Study. *European J. of Cancer*. 39: 2355-2363, 2003.
- Jones,A., Currie,J. Central nervous system. In Halnan , K.E. ed. *Treatment of cancer*. Pp. 191-221. London:Chapman and Hall ltd, 1982.
- Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br Dermatol* 2005; 0:1-9.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621-663.
- Karin, M., Cao, Y.X., Greten, F.R., Li, Z.W. (2002) NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*, 2 (4), 301-310.
- Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, and Weissman D. Mrna is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(13):12542-12550.
- Kanae E., Osamu H., Yusuke M. and Masanobu O. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2 /prostaglandin E2 and Toll-like receptor /MyD88 pathways. *Cancer Sci* 107 (2016) 391–397 doi: 10.1111/cas.12901
- Kawakami A, Osaka M, Aikawa M, Uematsu S, Akira S, Libby P et al. Toll-like receptor 2 mediates apolipoprotein CIII-induced monocyte activation. *Circulation Research* 2008;103(12):1402- 1409.
- Kawai K, Shimura H, Minagawa M, et al. Expression of functional toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes.*J Dermatol Sci* 2002; 30:185-194.
- Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer research* 2006;66:3859-68.
- Kim WY, Lee JW, Choi JJ, Choi CH, Kim TJ, Kim BG et al. Increased expression of Toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:300-5.

- Kim J, Modlin RL. Innate Immunity and the skin. In: Freedberg, IM, Eisen, AZ, Wolff, K, Austen, KF, Goldsmith, LA, Katz, SI, eds. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Vol. 1. New York: McGraw-Hill, 2003: 247–52.
- Kleihues P., Cavenee WK.: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. WHO Classification of Tumours. IARC Press, 29-39, 2000.
- Kollisch G, Kalali BN, Voelcker V, et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 2005;114:531-541.
- Kodaira Y, Nair SK, Wrenshall LE, Gilboa E, and Platt JL. Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. *Journal of Immunology* 2000;165(3):1599-1604.
- KORNGUTH S.E., KALINKE T., ROBINS H.I., COHEN J.D., TURSKI P.: Preferential binding of radiolabeled poly-L-lysines to C6 and U87 MG glioblastomas compared with endothelial cells in vitro. *Cancer Research*, 49, 6390-6395, November 15, 1989.
- Konopka G., Bonni A. Signaling Pathways Regulating Gliomagenesis. *Current Molecular Medicine*, 3, 73-84, 2003.
- Koski GK, Czerniecki BJ. Combining innate immunity with radiation therapy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2005;11:7-11.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, and Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through Toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103(4):1433-1437.
- Krieg AM. Therapeutic potential of Toll like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(6):471-84.
- Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O et al. NFκB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *Journal of Cell Biology.* 2004;166(3):369-380.
- Kundakcı A, Pirat A *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi* 2012; 10: 63-73
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology* 2000;1(5):398-401.

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
- Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F et al. An essential role of the NF- κ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *Journal of Immunology* 2001;166(12):7128-7135.
- Li, Q., Verma, I.M. (2002) NF-[kappa]B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2 (10), 725-734.
- Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: Nf-kappaB is the lynchpin. *Trends in immunology* 2005;26:318-25.
- Marienfeld, R., May, M.J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S., Neumann, M. (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (22), 19852-19860.
- Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-298.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- McCluskie MJ, Krieg AM. Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006; 311:155–78.
- McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The Role of Toll-like Receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005;125:1-8.
- Mengchu Zhu, Mei Wang, Fang Yang, Yiqing Tian, Jie Cai, Huan Yang, Hailong Fu, Fei Mao, Wei Zhu, Hui Qian and Wenrong Xu. miR-155-5p inhibition promotes the transition of bone marrow mesenchymal stem cells to gastric cancer tissue derived MSC-like cells via NF- κ B p65 activation. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 13. February 26, 2016
- Merlo A. Genes and Pathways driving Glioblastomas in Humans and Murine Disease Models. *Neurosurgery Reviews*; 26; 145-158, 2003.
- Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res* 2006;4:437-47.

- Metzhitov R, Janeway C Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343: 338-44.
- Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Medicine* 2009;15(7):774-780.
- Ming Shi , Xi Chen , Kangruo Ye , Yuanfei Yao , Yu Li . Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy. Received: 30 November 2015 / Received in final form: 23 March 2016 /Accepted: 24 May 2016
- Molteni M, Marabella D, Orlandi C, Rossetti C. Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and Express TLR-4. *Cancer letters* 2006;235:75-83.
- MORII K., TANAKA R., ONDA K., TSUMANUMA I., YOSHIMURA J.: Expression of telomerase RNA, Telomerase activity, and telomere length in human gliomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239, 830-834, 1997.
- Moorthy, A.K., Huang, D.-B., Wang, V.Y.-F., Vu, D., Ghosh, G. (2007) X-ray structure of a NF- κ B p50/RelB/DNA complex reveals assembly of multiple dimers on tandem κ B sites. *Journal of Molecular Biology*, 373 (3), 723-734.
- Modlin RL. Mammalian toll-like receptors. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:543-7.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
- Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll- like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:1093-102.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(4):297-309.
- Natoli, G., Saccani, S., Bosisio, D., Marazzi, I. (2005) Interactions of NF- κ B with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nature Immunology*, 6(5), 439-445.
- Nijhuis MMO, Pasterkamp G, Sluis NI, De Kleijn DPV, Laman JD, and Ulfman LH. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *Journal of Vascular Research* 2007;44(3):214-222.

- Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, et al. Prediction of the coding sequence of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1994;1:27- 35.
- O'Dea, E., Hoffmann, A. (2010) The regulatory logic of the NF- κ B signaling system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (1).
- Ogura Y, Sutterwala FS, and Flavell RA. The inflammasome: First line of the immune response to cell stress. *Cell* 2006; 126: 659–662
- Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, et al: Phosphatidylinositol kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine ex- pression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 2003; 335:97–605
- O'Neill LAJ. and Bowie A.G. The family of five: TIRdomaincontaining adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2007;7(5):353-364.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(13):10229-10233.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A et al. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(9):7370-7.
- Paul kleihues, md, david n. louis, md, bernd w. scheithauer, md, lucy b. rorke, md, guido reifenberger, md, phd, peter c. burger, md, and webster k. cavenee, phd, *The WHO Classification of Tumors of the Nervous System*, Vol. 61, No. 3 Copyright q 2002 by the American Association of Neuropathologists March, 2002 pp. 215 225
- PAUNU N.: Familial Glioma. *Acta Universitatis Tamperensis*, Teiskontie 35, Tampere, April, 2002.
- Paunu N.: Familial Glioma, Molecular Genetic and Epidemiological Study, Academic Dissertation. *Acta Universitatis Tamperensis*, 863: 20-55, 2002.
- Pahl HL. Activators and target genes of rel/ NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853–6866
- Peraud A., Friedrich W.K., Wiestler O.D., Kleihues P., Reulen H-J.: Prognostic Impact of TP53 Mutations and P53 Protein Overexpression in Supratentorial WHO Grade II

- Astrocytomas and Oligoastrocytomas. *Clinical Cancer Research*. 8; 1117- 1124, 2002.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431(7007):461-6.
- Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science*, 1998; 282(5396):2085-8.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282(5396):2085-2088.
- Qiutang Li, Sebo Withoff and Inder M. Verma. Inflammation-associated cancer: NF-kB is the lynchpin. Corresponding author: Verma, I.M. (verma@salk.edu). Both authors contributed equally to this work. Available online 25 April 2005
- R. Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 2007;449: 819–826.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. 2004 Dec;42(6):485-98.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 588- 93.
- Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007;12: 80-7.
- Rossignol DP, Lynn M. TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6:496-502.
- Ruse M, Knaus UG: New players in TLR- mediated innate immunity. *Immunologic Res* 2006; 34:33–48
- Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006;176:4894-901.
- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* 2007;13:4565-74.

- Sato M, Sano H, Iwakı D, et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NFkappa B activation and TNF-alpha secretion are downregulated by lung collectin surfactant protein, A. *J Immunol*, 2003;171: 417-25
- Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2005;295:179-85.
- Scott AM, Saleh M. The inflammatory caspases: Guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 2007; 14:23–31
- Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease. *Hepatology* 2008;48:322-35.
- Sengchanthalangsy, L.L., Datta, S., Huang, D.-B., Anderson, E., Braswell, E.H., Ghosh, G. (1999) Characterization of the dimer interface of transcription factor NF[kappa]B p50 homodimer. *Journal of Molecular Biology*, 289 (4), 1029-1040.
- Shimizu T, Kida Y, and Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor- κ B through Toll-like receptors 1 and 2. *Immunology* 2007;121(4):473-483.
- Smith KD. Toll-like receptors in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(3):189-196.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
- Tarbell NJ et al. The chance in patterns of relapse in medulloblastoma. *Cancer* 1991;68:1600-4.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaBdependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophageactivating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000;164:554-557.
- Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, and Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(17):17079-17084.

- Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, et al. Activation of Tolllike receptor 2 on human denritic cells triggers induction of IL-12 but not IL-10. *J Immunol* 2000;165:3804-3810.
- Tuba Turul, Fügen Ersoy. Dostu düşmanı ayıran bir dogal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 114-118
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-10.
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 2002; 14 (1): 103- 110.
- Utahaisangsook S, Day NK, Bahna SL et al. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002; 88:253-65.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H et al. Endocytosed HSP60s use Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(33):31332-9.
- Vallabhapurapu, S., Karin, M. (2009) Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 27, 693-733.
- Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L. ve diğerleri. (2007) Ribosomal protein S3: A KH domain subunit in NF- κ B complexes that mediates selective gene regulation. *Cell*, 131 (5), 927-939.
- Wan, F.Y., Lenardo, M.J. (2009) Specification of DNA binding activity of NF-kappa B proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (4).
- Warner S, Auger KR, Libby P. Recombinant human interleukin-1 induces interleukin-1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987; 139: 1911-1917.
- Watanabe T., Katayama Y., Yoshino A., Komine C., Yokoyama T. Deregulation of the TP53/P14 ARF Tumor Suppressor Pathway in Low-Grade Diffuse Astrocytomas and Its Influence on Clinical Course. 9; 4884-4890, 2003.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7:837-847
- Wieland Cw, Knapp S, Florquin S, et al. Non-mannosecapped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170: 1367-74.

- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in antibacterial responses. *J Immunol* 2000; 165:7125-32.
- Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *J Immunol* 2007; 178:5940–5948
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM et al. Evidence for an accessory protein function for Tolllike receptor 1 in antibacterial responses. *Journal of Immunology* 2000;165(12):7125–7132.
- Xiaoxia Li, Shihua Wang, Rongjia Zhu, Hongling Li, Qin Han and Robert Chunhua Zhao. Lung tumor exosomes induce a proinflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFκB-TLR signaling pathway. Li et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2016) 9:42 DOI 10.1186/s13045-016-0269-y
- Xue Xiao, Gong Yang, Peng Bai, Shunping Gui, Tri M. Bui Nyuyen, Imelda Mercado-Uribe, Mei Yang, Juan Zou, Qintong Li, Jianguo Xiao, Bin Chang, Guangzhi Liu, He Wang and Jinsong Liu. Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the tumor growth of ovarian cancer cell line derived from a low-grade papillary serous carcinoma in p53-independent pathway. Xiao et al. *BMC Cancer* (2016) 16:582 DOI 10.1186/s12885-016-2617-2
- Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001;104(25):3103-3108.
- Xu N, Yao HP, Sun Z, Chen Z. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(2):239-44.
- Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 2005;233:85-89.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2003;4:1144-50.

Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, Itoh H, Saito S, Kobayashi N et al. Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. The Journal of international medical research 2001;29:409-20.

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol 2002;168:554-61.

www.mcatürk.com/guncel_0310_sinirsistemimiz.htm

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000137462;r=4:154622652-154626851;t=ENST00000260010



ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 880

Tarih : 30.06.2016

Konu : Prof. Dr. Turgut ULUTİN

Sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN
Tıbbi Biyolog

İlgi: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığının 20/06/2016 gün ve 226913 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Arş. Gör. İdris KINA' nın yürüteceği 2016/830 dosya numaralı "NF-kB, TLR-4 ve TLR-2 Varyasyonlarının Glioma ile ilişkilerinin incelenmesi" başlıklı çalışma kurumumuzun 24/06/2016 tarih ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu