

T.C
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ÇÖLYAK HASTALIĞINDA
THEMIS VE RUNX 3 GENLERİNİN
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

HAZIRLAYAN
Mustafa KURTULUŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim PİRİM

2022-İZMİR

T.C
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ÇÖLYAK HASTALIĞINDA
THEMIS VE RUNX 3 GENLERİNİN
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

HAZIRLAYAN
Mustafa KURTULUŞ



DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Bu proje İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2020-TDR-SABE-0001 Proje numarasıyla Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2022-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29 /08 /2022

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim PİRİM, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi (İMZA)

Üye: Prof. Dr. Tülay AYNA KILIÇASLAN, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi (İMZA)

Üye: Prof. Dr. Hüseyin Sinan AKAY, S.B İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (İMZA)

Üye: Prof. Dr. Can DUMAN, İzmir Demokrasi Üniversitesi (İMZA)

Üye: Doç. Dr. Melek PEHLİVAN, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi (İMZA)

ONAY : Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA) (Ünvanı, Adı Soyadı) Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.
- Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)
- Tezimin..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

..../..../....

Ad-Soyad

Mustafa Kurtuluş

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. İbrahim PİRİM danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

....../....../....

Ad-Soyad

Mustafa Kurtuluş

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmam sűresince her tűrlű yardım ve fedakarlıęı saęlayan, bilgi ve tecrűbeleriyle çalıőmama ıőık tutan, ayrıca bana bu çalıőmayı vererek kendimi geliőtirmemde bűyűk katkısı olan baőtta deęerli danıőman hocam Prof. Dr. İbrahim PİRİM'e ve doktora eęitimimdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Tűlay AYNA KILIÇASLAN'a, Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e ve Doç. Dr. Melek PEHLİVAN'a; ayrıca tez çalıőmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Maőallah BARAN'a, Prof. Dr. Can DUMAN'a, Doç. Dr. Berk ÖZYILMAZ'a, Dr. Aslı ÖZKIZILCIK KOçYİęİT'e ve Aslı ELDEM'e sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

ÖZET

ÇÖLYAK HASTALIĞINDA THEMIS VE RUNX 3 GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Giriş-Amaç: Çölyak Hastalığı; en çok buğday, arpa ve çavdar ile az miktarda yulafta bulunan gluten ve ilişkili proteinlerin vücuda alınmasıyla; genetik olarak eğilimli kişilerde ortaya çıkan, immün kökenli bir enteropatidir. HLA-DQ2 ve/veya HLA-DQ8, barsak mukozasında bulunan immün sistemin özel CD4+ yardımcı T hücrelerine; glutenin, gliadin gibi alt birimlerinden birini sunarak Çölyak hastalığına hassasiyeti arttırmak için gereklidir. Fakat, hastalık gelişimi için bu işlem, tek başına yeterli değildir. Bu çalışmanın amacı, kromozom 6q22.33 bölgesinde bulunan THEMIS (Thymocyte-Expressed Molecule Involved in Selection = Seçimle İlgili Timosit Ekspresyon Molekülü) ve kromozom 1p36.11 bölgesinde bulunan RUNX3 (Runt-related transcription factor family =RUNT ilişkili transkripsiyon faktörleri ailesi) genlerinin, Çölyak Hastalığı teşhisi konmuş çocukların ince barsak biopsi materyali ve periferik kanındaki ekspresyonlarını incelemektir.

Materyal-Metod: Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Doku Tipleme laboratuvarında; hem yeni tanı almış hastaların hem de kontrol grubunun periferik kanından ve ince barsak doku biyopsilerinden total RNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzole edilen ve nanodropta ölçümü yapılan RNA'ların, cDNA sentez kiti ile cDNA'ya çevrilerek; SYBRGreen Real-Time PCR yöntemi ile gen ifade analizleri yapılmıştır.

Sonuç: Bu çalışmamızda, THEMIS ve RUNX 3 genlerinin dokudaki ekspresyonlarının periferik kandan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hastalarımızda gerek Tip I Diabetes Mellitus'a yakalanma olasılığı (%16.6) gerekse HLA dağılımları dünya literatürüne göre yüksektir. Ancak çocukluk çağlarında ince barsak biyopsisi yapma zorunluluğu ve Covid-19 pandemisi bu çalışmamızda vaka sayılarını sınırlandırıcı faktörler olmuştur. Buna karşılık, ÇH'da bulunan HLA DQ2,5 ile DQ8 doku tiplerine sahip hastalarda; RUNX 3 ekspresyonları farklı bulunmuştur. Aynı şekilde dokuda THEMIS yükselmektedir ve THEMIS'in dokularda düşük bulunması durumunda, kişilerde başka bir otoimmün hastalık araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Çölyak Hastalığı, THEMIS, RUNX 3

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THEMIS AND RUNX 3 GENE EXPRESSIONS IN CELIAC DISEASE

Introduction-Aim: Celiac Disease; It is an enteropathy of Immune origin that occurs in genetically predisposed individuals, by the ingestion of gluten and related proteins, which are present predominantly in wheat, barley and rye, and, in a small proportion of oats. While HLA-DQ2 and / or HLA-DQ8 are required to increase sensitivity to Celiac disease by introducing glutenin gliadin subunits to specific CD4 + T-helper cells of the Immune system in the intestinal mucosa; alone is not enough for disease development. The aim of this study is to investigate the expression of THEMIS (Thymocyte-Expressed Molecule Involved in Selection) and RUNX 3 (Runt-related transcription factor family) genes in small intestine biopsy materials and peripheral blood samples of children diagnosed with Celiac Disease.

Materials and Methods: Total RNA isolation performed after the serum is separated from the peripheral blood of both patients and control groups, in Tissue Typing Laboratory in Tepecik Training and Research Hospital. In addition, total RNA isolations performed in small intestine biopsies taken from newly diagnosed patients. Isolated and at nanodrop measured RNAs are converted to cDNA by cDNA synthesis kit and gene expression analysis performed by SYBRGreen Real-Time PCR method.

Results: In this study, we found that the expression of THEMIS and RUNX 3 genes in tissue was higher than in peripheral blood. In addition, the incidence of type I Diabetes Mellitus in Celiac Patients was found to be 16.66% above the world literature. Likewise, the distribution of HLA groups was found to be high. However, the limitations caused by performing a biopsy in childhood and the Covid-19 pandemic limited the number of cases. In contrast, RUNX 3 expressions were found to be different in patients with HLA DQ2,5 and DQ8 tissue types found in Celiac Disease. In the same way, THEMIS is elevated in the tissue, and if THEMIS is found to be low in the tissues, another autoimmune disease should be investigated in people.

Keywords: Celiac Disease, THEMIS, RUNX 3

İÇİNDEKİLER

Onay	i
Yayımlama ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı	ii
Etik Beyan Sayfası	iii
Teşekkür	iv
Özet	v
Abstract	vi
İçindekiler	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Tablolar	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Çölyak Hastalığı	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Etyopatogenez	3
2.1.3. Moleküler Mekanizma	5
2.1.4. Çölyak Hastalığı Türleri	6
2.1.5. Çölyak Hastalığının Genetiği	7
2.1.6. Çölyak Hastalığında İmmünoloji	13
2.2. THEMIS	16
2.3. RUNX Ailesi	21
3. GEREÇ VEYÖNTEM	36
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC.....	Antijen sunan hücreler
CBF β	Kora bağlanan faktör β
CTL.....	Sitotoksik T lenfosit
ÇH.....	Çölyak Hastalığı
DC.....	Dendritik hücre
DETC.....	Dendritik Epidermal T hücre
DN.....	Çift negatif
DP.....	Çift pozitif
EmA.....	Anti- endomisyal antikorlar
ERK.....	Extraselüler sinyalle regüle kinaz
Fr	Düzenlenmiş kat değişimi
Fc.....	Kat değişimi
Gasp	Grb2-ilişkili protein
GFD.....	Glutensiz beslenme
GRB2.....	Büyüme faktörü reseptörüne bağlanan protein 2
GWAS.....	Genom-boyunca bağlantı çalışmaları
HLA.....	İnsan Lökosit Antijeni
HSC.....	Hematopoetik Kök Hücre
ICAM-3.....	Hücreler arası adhezyon molekülü 3
IEL.....	İntestinal epitelyal lenfositler
IFN γ	İnterferon γ
IL-2.....	İnterlökin-2
LCK.....	Lenfosit spesifik protein triozin kinaz
LTi.....	Lenfoid Doku İndükleyici
MHC.....	Majör hiskompatibilite kompleksi
NK.....	Doğal öldürücü
PTPRK.....	Protein tirozin fosfataz, reseptör tipi, kappa
RAG1.....	Rekombinasyon aktivasyon geni 1

RUNX 3.....	Runt-domaini transkripsiyon faktörleri X3
self-pMHC.....	Kendi peptidini sunan majör histokompatibilite kompleksi
SHP1 ve 2.....	Tirozin fosfataz 1 ve 2
SN.....	Tek negatif
SP.....	Tek pozitif
TCR.....	T Hücre Reseptörü
TGF β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
Th1.....	Yardımcı T hücresi tip 1
THEMIS.....	Timositte ifade edilen seçimde rol oynayan molekül
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
Treg.....	Regülatör T hücresi
tTG.....	doku Transglutaminaz

ŞEKİLLER

Şekil.1. ÇH ile ilişkili faktörler (Kaynak 15'ten Türkçeleştirilmiştir).

Şekil.2.Şekil.2.ÇH'da kazanılmış ve doğal İmmün yanıt mekanizmaları (23).

Şekil.3. ÇH'nın patogenezinin altında yatan olası mekanizmalar (23).

Şekil.4.TCR sinyalinin THEMIS aracılı mekanizmayla zayıflatılması (30).

Şekil.5.Timosit seçilmesi esnasında, TCR sinyalinin THEMIS-SHP kompleksi üzerinden çalışma modeli (30).

Şekil.6.RUNX ve T lenfosit diferansiasyonu

Şekil.7. B hücre gelişiminde ve humoral İmmünette RUNX

Şekil.8.İmmün yanıtta RUNX 3.

Şekil.9. NK hücre gelişimi

Şekil.10. Mukozal İmmünette RUNX

Şekil.11. A- Melting Analizi

Şekil.12. Bu çalışmada incelenen 12 Çölyak hastası kan ve doku örnekleri

TABLULAR

Tablo.1.ÇH'da hassas genler

Tablo.2. Çalışmada kullanılan ÇH. hasta tablosu

Tablo.3.Hastaların verileri

Tablo.4. Çalışmada kullanılan kontrol grubu tablosu

Tablo.5. 96 kuyucuklu plakta dizilim

Tablo.6. Hasta verilerinin analiz tablosu,

Tablo.7. Kontrol grubu verilerinin analiz tablosu

Tablo.8.Hastalara ait THEMIS ekspresyon değerleri

Tablo.9.Hastalara ait RUNX 3 ekspresyon değerleri

Tablo.10. Çölyak Tanılı Hasta Demografik ve Klinik Bilgileri

Tablo.11. Hastaların THEMIS ve RUNX 3 ekspresyon tablosu

Tablo.12. Hastaların THEMIS ve RUNX 3 ekspresyon grafiği

Tablo.13.Hastaların Transglutaminaz Antikor IGA ve IGG Değerlerinin Karşılaştırılması

Tablo.14. Hastalarda HLA doku grubu dağılımı grafiği

Tablo.15. Hastaların Antiendomisyum Antikor IGA ve IGG Değerlerinin Karşılaştırılması

Tablo.16.Marsh Sınıflamasına Göre Ekspresyon

Tablo.17. Transglutaminaz IGA Antikorlarına Göre Ekspresyon

Tablo.18. Transglutaminaz IGG Antikorlarına Göre Ekspresyon

Tablo.19. Anti Endomisyum IGA Antikorlarına Göre Ekspresyon

Tablo.20. Anti Endomisyum IGG Antikorlarına Göre Ekspresyon

Tablo.21. Yaşa göre genlerin ekspresyon oranları

Tablo.22. HLA DQ8 doku grubu hastaların verileri

1.GİRİŞ

Çölyak Hastalığı (ÇH), buğday, arpa, çavdar ve bir miktar da yulafta bulunan; glutenin ve gliadin gibi gluten ilişkili proteinlerin vücuda alınmasıyla, genetik olarak hassas kişilerde gelişen, poligenik; İmmün kökenli ve toplumda yaklaşık 1/100 oranında görülen bir gastrointestinal sistem enteropatisidir. Villöz atrofi, kript hiperplazisi ve ince barsak mukozasında lenfositokin infiltrasyonu ile karakterize histolojik bulguları olan ÇH; ayrıca, mukozada da hafif değişiklikler içerir. Tipik gastrointestinal semptomlardan, ekstraintestinal bulgulara kadar çok farklı klinik tablolar gösterir. Tek etkili tedavi şekli, ömür boyu glutensiz diyetdir (1).

ÇH, multifaktöriyel, poligenik bir hastalık olup en önemli genetik hassasiyet gösteren bölge Majör hiskompatibilite kompleksi (MHC) lokusundadır. Hassas kişilerde bu lokusta kodlanmakta olan insan lökosit antijenleri (**HLA-DQ2,5** (DQA1*05, DQB1*02) ve/veya **HLA-DQ8** (DQA1*03, DQB1*03:02)'dir. Ancak, bu lokustaki bu kanıt tek başına hastalık gelişimi için yeterli değildir. Bu hassas alleller genetik riskin yaklaşık %35'ini açıklarken, diğer birçok gen de ÇH. patogeneğinde rol alır (2).

Şimdiye dek, yapılmış iki genom-boyunca bağlantı çalışmaları (GWAS) çalışması, ÇH. gelişiminde 26 bölgenin etkin olduğunu göstermiştir (2,3). Hastalığın etyolojik araştırmalarında tespit edilen bazı genler; İmmün cevap yollarında görev alırken (RGS1, IL18R1/IL18RAP, CCR3, IL12A/SCHIP1, TAGAP, SH2B3, BACH2, CCR4, CD80, CIITA-SOCS1-CLEC16A, ICOSLG, ZMIZI) bazıları da T-hücre olgunlaşmasında görev alır (ETS1, Runt-domaini transkripsiyon faktörleri X3 (RUNX 3), Timositte ifade edilen seçimde rol oynayan molekül (THEMIS), Protein tirozin fosfataz, reseptör tipi, kappa (PTPRK) veya TNFRSF14). Daha sonra yapılan İmmünochip genotipleme yöntemi ile tüm bu 26 bölge haritalanmış ve 13 hassas lokus daha bulunmuştur (4). Bu toplam 39 non-HLA gen bölgesinden birçoğu ÇH. gelişimi ile ilgiliyken, diğer yandan da tip 1 Diabetes Mellitus ve Romatoid Artrit gibi başka otoimmün hastalıklarla da ilişkilidir

THEMIS geninin ifade düzeyi lenfoid dokuyla sınırlıdır ve farelerde pre-T Hücre Reseptörü (TCR) timositlerde T hücre gelişiminde önemli rolü olan bir molekülü yüksek oranda kodladığı saptanmıştır (5). Ayrıca farklılaşmış T lenfositlerde de eksprese olup (6), TCR aktivasyonunda sinyal rolü olduğu da düşünülmektedir (7). THEMIS, kemirgenlerin gelişiminde normal CD4+ T hücrelerinde bulunmaktadır (8). RUNX 3 geni ise memelilerdeki, yapısı basit ama iyi korunmuş RUNX gen ailesinin üç üyesinden biri (RUNX 1, RUNX 2 ve RUNX 3) olup transkripsiyon faktörüdür. RUNX ailesi; nörogenez, osteogenez ve hematopoez gibi önemli gelişimsel süreçlerde anahtar rol oynayan, gen ekspresyon düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (9).

Bu çalışmanın amacı, THEMIS ve RUNX 3 genlerinin; yeni tanı almış, aktif Çölyak bulgularına sahip hastalarla kontrol grubunun, duodenal mukozasındaki ve periferik kandaki ekspresyon düzeylerini ölçmektir. Ayrıca tanı konmuş bu hastalar ile kontrol grubunun HLA grupları belirlenerek; HLA tipiyle bu genlerin ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması da gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte İmmünogenetik bir hastalık olarak ÇH'da, Tip 1 Diabetes Mellitus gibi diğer İmmünogenetik hastalıklarla bir korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

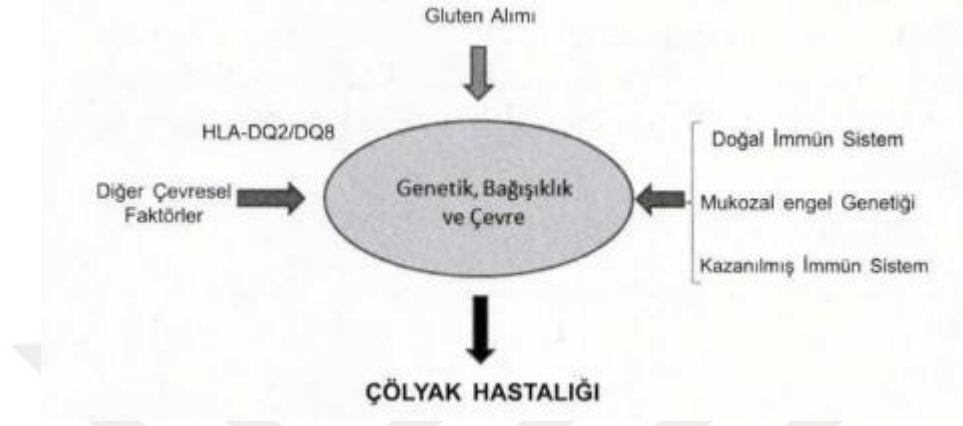
2.1.Çölyak Hastalığı

2.1.1.Tarihçe

Çölyak Hastalığı, insanlığın avcı toplumdaki tarım toplumuna geçişiyle beraber; yaklaşık 10.000 yıl önce ve ilk tahılın yetiştirilmesiyle tahminen ilk olarak Mezopotamya’da ortaya çıkmıştır (10). Her ne kadar arkeolojik araştırmalar milattan sonra 1. ve 2. yüzyıla kadar dayandırılrsa da (11), bu dönemlerde yaşamış olan Yunanlı Fizikçi Arataeus’un Yunanca yazmış olduğu kitabının Francis Adams tarafından 1856 yılında İngilizceye çevirmesiyle asıl olarak tarihteki yerini almıştır (12). “The Extant Works of Aretaeus, The Cappadocian” adı ile çevrilen eserin “On The Coeliac Affection” kısmında bu hastalıktan bağırsak kaynaklı olduğunu belirtecek şekilde “koiliakos” (bağırsakların zarara uğraması) olarak bahsetmiştir. Yunanca’da; karınla ilgili anlamına gelen “koelia” kelimesinden türemiş olan ÇH; genel olarak belirtilerini kronik ishal, karın şişkinliği ve ilerleyen aşırı zayıflık olarak tanımlamıştır (10,13).

Ç.H’nın ilk modern klinik açıklaması 1888 yılında İngiliz Doktor Samuel Jones Gee tarafından yapılmış olmasına rağmen 1950’lere kadar hastalığın tedavisine yönelik bir gelişme kaydedilememiştir. Fakat İkinci Dünya Savaşı döneminde bulunamayan buğday, arpa ve çavdarın yenememesi sonucu Ç.H tanılı çocukların sağlığında iyileşmeler kaydedildiğinin Hollandalı bir pediatrist olan Willem Karel Dicke (1905-1962) tarafından gözlenmesiyle; hastalığın tedavisinde, günümüzde de kabul edilen ilerlemeler yaşanmaya başlanmıştır (14).

2.1.2.Etyopatogenez



Şekil.1. ÇH ile ilişkili faktörler (Kaynak 15'ten değiştirilmiştir).

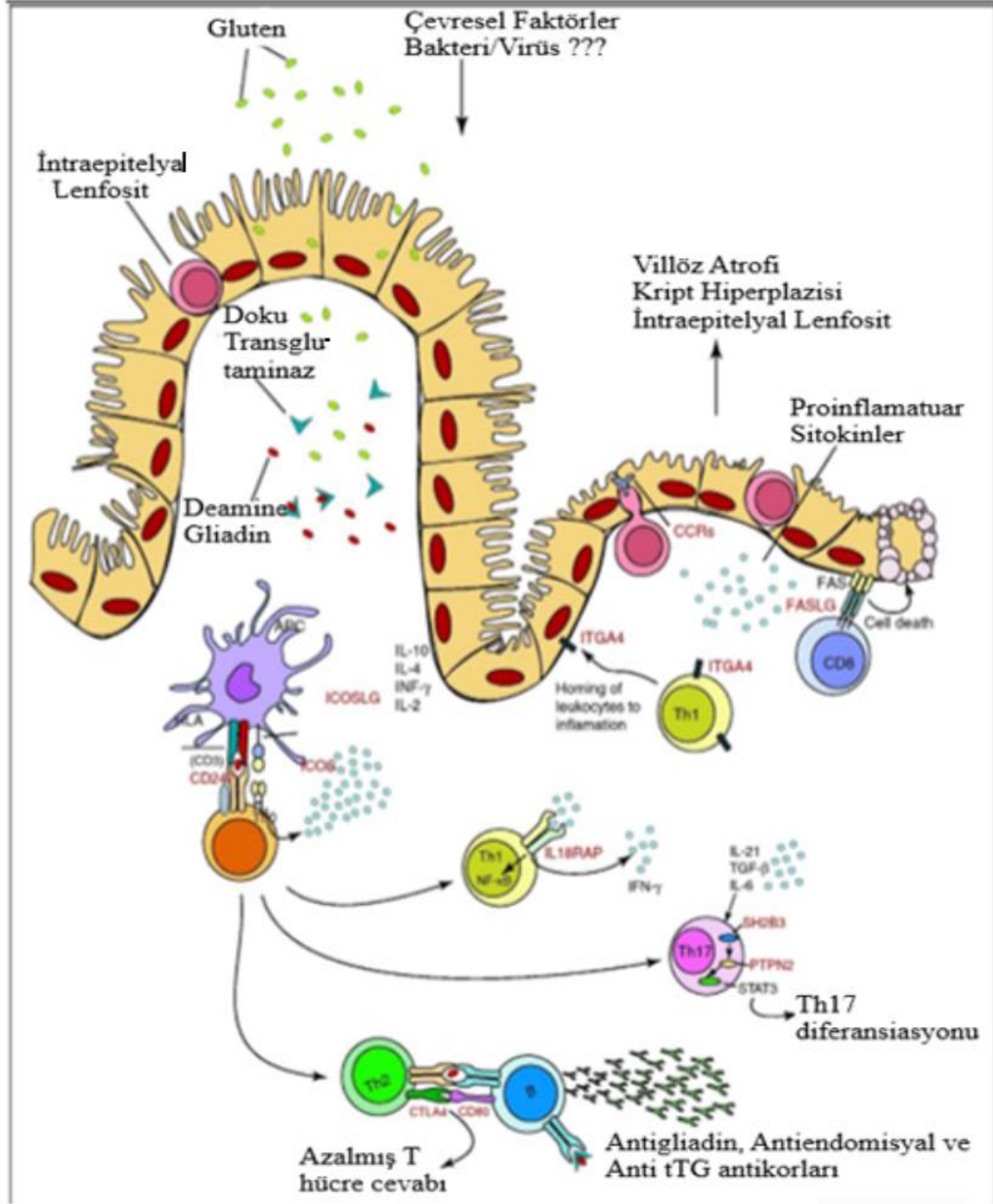
Ç.H (gluten enteropatisi veya celiac sprue diye de bilinir), hem çevresel hem de genetik faktörlerin insan lökosit antijeni (HLA) ve non-HLA genlerin birleşmesi sonucu ortaya çıkan multifaktoriyel genetik bozukluklardan bir tanesidir (Şekil.1). Gluten, bitkisel bir protein olarak buğday, arpa, çavdar ve az bir miktar olarak da yulafta bulunmakta olup; bu proteinin alımı ile, hücrel ve humoral immün sistem aktivasyonu sonucu Ç.H oluşmaktadır. Günümüzde ÇH'nın, doğuştan genetik yatkınlığa sahip olan bireylerde; bazı çevresel koşulların ortaya çıkmasıyla hastalığa dönüştüğü kabul edilir (16).

Çölyak hastalığının "İmmünogenetik" bir hastalık olduğu söylendiğinde; genetik zeminin üzerinde, iki ana İmmün yanıt sisteminin de hastalıktan sorumlu olduğu bilinmektedir: Kazanılmış İmmün yanıt (HLA-spesifik) ve doğal İmmün yanıt (HLA tipinden bağımsız). Belli HLA tipleri ile ilişkisi, ÇH'nın İmmünolojik olarak doğuştan yatkınlığını destekliyor. Ancak literatürde Non HLA'lar da var ki, bu tip hastalarda belki çevresel faktörlerin daha etkili olduğu düşünülebilir. Bir de HLA ve Non HLA arasında klinik tablo olarak şiddet farkı araştırılırken; özellikle Covid-19 pandemisinin hüküm sürdüğü bu çalışma sürecinde, belli HLA grubu hastalarının hastanelere gitmesini de değiştirmiş olabileceği akılda tutulmalıdır.

Temelde Ç.H, günümüzde her yaşta görülebilen genel bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (17). Çocuklarda sıklıkla kronik ishal, büyüme geriliği, karın şişliği, daha ilerlediği takdirde demir eksikliği ve protein, enerji malnütrisyonu ile ortaya çıkarken, ileri yaşlarda daha çok gastrointestinal sistem dışı bulgularla veya daha hafif ve atipik şekillerde karşımıza gelebilmektedir (16).

Hastalıkta anti-doku transglutaminaz (anti-tissue TG, anti-tTG) ve anti-endomisyal (EmA) antikolar oluşmaktadır. Anti-tTG ve EmA antikolarının yüksekliği; hastalığın aktif fazında çok iyi birer gösterge (marker) iken; kesin tanı ince barsak biyopsisinde villusun bozulmuş yapısı, kript hiperplazisi ve lökosit infiltrasyonu gibi tipik histolojik anormalliklerinin görülebilmesi ile konur (17).

Gluten peptitleri epitelyal bariyerden geçerek doku transglutaminaz (tTG) ile deamine olmaktadır. Lamina propriadaki CD4+T hücreleri, antijen sunan hücrelerin (APC) hücre yüzeylerinde bulunan HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 molekülleriyle bağlanmış bu gluten peptitlerini tanımaktadır. Epitelde CD8+ T hücreleri ise NKG2D gibi doğal katil (NK) hücre reseptörlerini eksprese etmektedir. Gluten için spesifik olan B hücreleri de lamina propriadadır. NKG2D tarafından uyarılıp düzenlenen intraepitelyal T hücreleri, MIC moleküllerini eksprese etmekte olan ince barsak enterositlerini direkt olarak yok etmekte ya da (T hücre reseptörü) TCR aktivasyon eşliğini düşürmektedir. Gluten, IL-15 ekspresyonunu da arttırarak, NKG2D ve MIC ekspresyonunu başlatmaktadır. HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 molekülleri tTG tarafından deamine edilmiş olan gluten peptitlerine, iyonik bağ nedeniyle yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Gluten spesifik T hücreleri aynı zamanda tTG'ye karşı, antikor oluşumunu da kontrol etmektedir (Şekil 2).



Şekil.2. ÇH’da kazanılmış ve doğal İmmün yanıt mekanizmaları (23).

Duodenal biyopsi, serolojik testleri pozitif olan hastalarda yapılmalıdır. İnce bağırsak mukozasındaki histolojik değişiklikler, intraepitelyal lenfosit (IEL) artışı, kript hiperplazisi ve villus atrofi olarak ortaya çıkmakta ve hastalığın tanı kriterlerindedir. Bu histolojik bulgular; aynı zamanda hastalığın klinik bulgularının şiddetiyle de orantılı olup, sadece IEL artışından, total mukozal atrofi, total villus

kaybı ve kriptlerin aşırı hiperplazisi olan ileri evre olgulara kadar değişebilir. Histolojik bulgular, Marsh-Oberhuber sınıflandırmasına göre tanımlanabilir;

- Marsh 0 (Ön süzülme-preinfiltratif): Histolojik bulguları normaldir. Her 100 enterositte (bağırsak mukozasında emilim yapan hücrede) 30'dan az IEL saptanır, kript ve villus normaldir.

- Marsh 1 (Süzülme-infiltratif): Sadece 30'dan çok IEL saptanır, kript ve villus normaldir. Belirtiler ÇH'na spesifik olmayıp, Crohn hastalığı, Helicobacter pylori olması ya da bakteriyel aşırı büyüme (overgrowth) gibi durumlarda da görülebilir.

- Marsh 2 (Aşırı süzülme-hiperplastik-infiltratif): Her 100 enterositte, 30'dan fazla IEL saptanır ve minimal kript hiperplazisi görülür. Villus normaldir.

- Marsh 3a (Yıkıcı-düz destrüktif): 30'dan çok IEL infiltrasyonu dışında, başlangıç kript hiperplazisi ve villus atrofisi görülmeye başlar.

- Marsh 3b (Yıkıcı-düz destrüktif): IEL infiltrasyonu, orta derecede kript hiperplazisi ve villus atrofisi görülür.

- Marsh 3c (Yıkıcı-düz destrüktif): IEL infiltrasyonu, total villus atrofisi ve kript hiperplazisi görülür.

- Marsh 4 (Tamamen düzleşme-hipoplastik-atrofik): IEL infiltrasyonu, total villus atrofisi ve total kript hiperplazisi görülür (27).

2.1.3.Moleküler Mekanizma

Çölyak hastalığının “İmmünogenetik” bir hastalık olduğu söylendiğinde; genetik zeminin üzerinde, iki ana İmmün yanıt sisteminin de hastalıktan sorumlu olduğu yukarıda belirtilmişti: Kazanılmış İmmün yanıt (HLA-spesifik) ve doğal İmmün yanıt (HLA tipinden bağımsız).

tTG, tüm dokularda bulunan ve vücudu yara iyileşmesi ve kemik büyümesi yoluyla koruyan bir enzimdir. Glutenin vücuda alınmasıyla tTG, bağırsakta gliadini

ve diğler gluten peptitlerini negatif yükleyerek deamine eder. Lamina propriada bulunan antijen sunan hücrelerin (APC) yüzeyindeki HLA proteinleri DQ2 ve DQ8'in her ikisi de, bu negatif yüklü deamine olmuş gluten peptitlerine tercihli olarak bağlanır. CD4+ yardımcı T hücreleri, APC'ler üzerindeki DQ2 veya DQ8'e bağli deamine gluten peptitlerini tanıyarak aktive olur ve en çok interferon gamma'yı (IFN- γ) da içeren çok sayıdaki sitokinleri üretmeye başlar. Gittikçe şiddetlenen enflamatuvar yanıt, villus zedelenmesine neden olan ek sitokinlerin ve kimyasalların salınımına yol açar. Ayrıca bağırsak dokusundaki plazma hücreleri de, anti-gliadin ve EmA antikörlerini ve otoimmün antikor olan tTG'ları salgılar (Şekil.2).

Sonuç olarak, Ç.H'nın patogenezinde CD4+ yardımcı T hücreleriyle ilişkili kazanılmış immün mekanizmanın yanında, epiteldeki CD8+ sitotoksik T lenfositlerle ilişkili bir doğal yanıtın da rolü vardır. Ç.H'da gluten, IEL'den IFN- γ ile beraber interlökin-15 (IL-15) sitokininin aşırı üretimine de neden olur. Bu sitokin molekülleri CD8+ T hücrelerinin yüzeyindeki NK reseptörlerinin ekspresyonlarını da arttırarak T-hücrelerine NK-benzer (NK like) özellikler kazandırır. Bu nedenle hem CD4+ hem CD8+ T-hücrelerinin bağırsak epitel hücrelerine gelişi güzel ve şiddetli bir şekilde saldırması sonucu bağırsak hasarı ortaya çıkar (Şekil 2).

2.1.4.Çölyak Hastalığı Türleri

ÇH; klasik form, atipik form, asemptomatik-sessiz form, refrakter form, latent form, olmak üzere 5 gruptan oluşur (19).

Klasik Form:

Kronik ishal ile birlikte, yağlı dışkı (steatore), karın şişkinliğı ve emilim bozukluğuna bağli bazı vitamin ve besinlerin eksiklikleri ile kilo kaybı görölmektedir. Çocuk hastalarda klinik semptomlar genellikle 6-18 aylarda ortaya çıkmaktadır. Klasik formun göröldüğü bu hastalarda kusma, dışkılama değışiklikleri, kas güçsüzlüğü, kas kaybı, büyüme ve gelişme geriliğı ile iştah azlığı görölmektedir. 1-2 yaş arası çocuklarda, vücudun besinlerden aldığı proteini tam sindirememesiyle ortaya çıkan, hayatı tehdit edici, hipoproteinemik ödemle beraber Çölyak krizi

görülebilmektedir (20,21). Erişkin hastalarda ise ishal, şişkinlik ve karın şişliği gibi daha hafif belirtilerle seyretmektedir.

Atipik Form:

Daha çok yetişkinlerde görülen bu tip, genellikle gastrointestinal belirtiler göstermez. Atipik formda intestinal bulgulardan daha çok romatolojik, hematolojik, üriner, nörolojik ve endokrin belirtiler görülmektedir.

Sessiz Form (Asemptomatik):

Asemptomatik formda, klinik hiçbir bulgu yoktur. Bu yüzden tanı koymak zordur ve genellikle hastalık belirlenemez. ÇH'nın en yaygın görülen çeşidi olduğu düşünülmektedir.

Refrakter Form:

Bir seneden daha fazla süre; glutensiz diyetle tedavi edilmesine karşın, klinik bulguların, tablonun ve yakınmaların azalmadığı ÇH tipidir. Toplumda bulunan bütün ÇH'larının yaklaşık %7-8'ini oluşturmasına rağmen, mortalite oranı en yüksek tipidir.

Latent Form:

Bazı hastalarda glutenli diyetle rağmen bağırsak mukoza histolojisi normaldir. Genellikle belirti ya çok azdır ya da hiç yoktur ve tanı çoğunlukla çocukluk çağında konmuştur ancak hastalık ilerleyen dönemde glutensiz diyet ile tamamen düzelmiştir. Ancak ilerleyen dönemde bu hastalarda tekrar semptomlar gelişebilir (22).

2.1.5.Çölyak Hastalığının Genetiği:

APC'de bulunan HLA molekülleri, antijenleri bağlayarak onları T lenfositlerine sunar. HLA sınıf I bölgesinden kodlanan HLA sınıf I molekülleri, endojen antijenleri CD8 + T hücrelerine sunarak özellikle sitotoksik bir yanıtı aktive ederken; HLA sınıf II bölgesinden kodlanan HLA sınıf II heterodimerleri ise, eksojen antijenleri CD4+ T hücrelerine sunar. CD4+ T hücreleri hücresel ve

humoral reaksiyonları yönetirler. APC olarak makrofaj, B lenfositleri, dentritik hücreler, Langerhans hücreleri, endotel hücreleri ve aktif T hücreleri sayılabilir.

HLA sınıf II molekülleri %35 civarında genetik risk oluşturan ve ÇH'na eğilim yaratan en önemli risk faktörüdür (2). Çölyak Hastalarının %90'dan fazlası HLA DQ2 heterodimerine sahipken, kalanı HLA DQ8 molekülünü eksprese etmektedir. HLA molekülü α ve β olmak üzere iki ayrı zincirin birleşmesinden meydana gelirken; HLA DQ2 heterodimerinde bu iki zincir sırasıyla HLA DQA1*05 ve HLA DQB1*02 tarafından şifrelenir. Bu iki allel gen diğer otoimmün bozukluklarda çoğunlukla görülen DR3 haplotipinde *cis* formunda yer almaktadır (23). Çölyak hastalarının küçük bir kısmında HLA DQ8 pozitif olup, bunun α ve β zincirleri HLA DQA1*03 ve HLA DQB1*0302 tarafından kodlanmaktadır.

ÇH'nın kalıtımsallığı %80 civarında olduğu ve HLA'nın genetik riske %35 oranında katkı sağladığı tahmin edilmektedir. Bu durumda bu hastalığa duyarlılıkta, daha fazla genetik risk faktörünün ilişkili olması gerekmektedir. Çünkü HLA'ları birebir aynı tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinde yapılan araştırmaya göre; ÇH'nın uyum oranında büyük bir çelişki vardır. Tek yumurta ikizlerinde ÇH görülme oranı %75-86 arasındayken; çift yumurta ikizlerinden birinde hastalık tespit edildiğinde diğer ikizde görülme olasılığı %16-20 arasındadır (24). ÇH ile ilgili yapılan GWAS çalışmaları sonucunda, 26 non-HLA lokusu ve hastalığı predispoze eden 13 ayrı lokus tespit edilmiştir. GWAS'ın çalışmaları ve kompleks hastalıklara uygulamaları ile ilgili araştırmalar; non HLA Çölyak genleri ile ilgili önemli yenilikleri de ortaya koymuştu.

Toplamda 39 non HLA Çölyak lokusu, 203 farklı geni kapsamaktadır (23). Non HLA Çölyak lokusunun en az 28 tanesi bağışıklıkla ilgili genleri barındırarak, ÇH'nın altında yatan bozulmuş bağışıklık sistemine dikkat çekmektedir. ÇH'nın biyolojisi hakkındaki bilgilere dayanılarak, bu 28 bölgedeki en olası bağışıklık ile ilgili genler gruplara ayrılabilir. Bu genlerin geniş yelpazeli işlevleri vardır ve seyirleri düzenlerler (Tablo 1).

Tablo 1: ÇH’da hassas genler: fonksiyonları, yolakları ve diğer hastalıklarla ilişkileri (23).

Hastalık	Kromozom bölgesi	Bölgedeki Genler	En büyük gen tarafından kodlanan fonksiyon	Yolak
ÇH	12q24.12*	<i>CUX2</i> , <i>FAM109A</i> , <i>ATXN2</i> , <i>TMEM116</i> , <i>SH2B3</i> , <i>RPL6</i> , <i>ERP29</i> , <i>TRAFD1</i> , <i>A CAD10</i> , <i>PTPN11</i> , <i>MAPKAPK5</i> , <i>BRA P</i> , <i>ALDH2</i>	SH2B3: T hücre reseptör regülasyonu, growth faktör ve sitokin reseptör-aracılı sinyaller	İmmün hücre sinyali
ÇH	10q22.3	<i>ZMIZ1</i>	ZMIZ1: Önemli transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenler ve Dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) sinyallerini ayarlar	İmmün hücre sinyali
ÇH	18p11.21	<i>PTPN2</i>	PTPN2 (T cell protein tyrosine phosphatase-nonreceptor 2): IL-6 aracılı STAT3 fosforilasyon ve aktivasyonunu baskılar	İmmün hücre sinyali
ÇH	2q33.2	<i>CTLA4</i> , <i>ICOS</i>	CTLA4: T hücre cevabının negatif düzenleyicisi. ICOS: CTLA-4 hücre yüzey reseptör ailesi üyesi	İmmün hücre sinyali
ÇH	14q24.1	<i>ZFP36L1</i>	ZFP36L1: varsayılan nükleer transkripsiyon faktörü, büyüme faktörlerine yanıtını düzenleyebilir	İmmün hücre sinyali
ÇH	16p13.13	<i>TNP2</i> , <i>PRM3</i> , <i>PRM2</i> , <i>PRM1</i> , <i>SOCS1</i> , <i>CLEC16A</i>	SOCS1:interlökin 2 (IL-2) ve IFN γ tarafından ekspresyonu düzenlenip sitokin sinyallerini güçlendirir	İmmün hücre sinyali
ÇH	1q24.2	<i>CD247</i>	CD247: CD3 reseptör kompleksinin parçası ve hücre içi sinyal iletim yollarında çift antijen tanıma. Düşük ekspresyon bağışıklık yanıtını bozar.	İmmün hücre sinyali
ÇH	21q22.3	<i>ICOSLG</i> , <i>RRP1</i> /// <i>A P001053.1</i>	ICOSLG: T hücre aktivasyonunu düzenler, IL-10 ekspresyonunu artırır. CTLA4/CD28 ailesinin üyesi. RRP1: Geç safha nukleogeneziste ve mitozisin sonunda dahil olur.	İmmün hücre sinyali
ÇH	1q31.2	<i>RGS1</i>	RGS1: Kemokine reseptör sinyallerini düzenler, B-hücre aktivasyonunda ve proliferasyonunda görev alır. Özel olarak İntestinal intraepitelyal lenfositlerde eksprese olur	İmmün hücre sinyali
ÇH	3q13.33	<i>CDGAP</i> , <i>TMEM39A</i> , <i>KTELCL1</i> , <i>CD80</i>	CD80: T hücre cevabını azaltan CTLA-4’e bağlanabilir. CD80, B hücre ve monosit aktivasyonunda eksprese olur	İmmün hücre sinyali
ÇH	6q25.3	<i>RSPH3</i> , <i>TAGAP</i>	TAGAP: RhoGTPase-activating proteindir, sitoskeleton değişimlerinde ve T hücre aktivasyonunda eksprese olmaktadır	İmmün hücre sinyali
ÇH	1q24.3	<i>FASLG</i> , <i>TNFSF18</i> , <i>TNFSF4</i>	FASLG: Sitotoksik T hücre aracılı apoptozis ve T hücre gelişiminde görev alan FAS’a bağlanan bir sitokindir. TNFSF18: Periferik dokudaki T hücre yaşamında görevli. TNFSF4: T hücre-APC etkileşiminde görevli	İmmün hücre sinyali

ÇH	11q24.3	<i>ETS1</i>	ETS1: RUNX 3 ekspresyonu ile beraber timusta CD8 farklılaşmasında anahtar rolde	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	1p36.32	<i>PANK4 , MMEL1 , PLCH2 , HES5 , TNFRSF14</i>	MMEL1: Membran metallo-endopeptidaz ailesi üyesi. TNFRSF14: Herpes simplex virüs giriş mekanizmasının bir parçası, duble-pozitif timosit apoptozisini ayarlar	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	1p36.11	<i>RUNX 3</i>	RUNX 3: Yardımcı T hücresi tip 1 (Th1) hücreleri içindeki CD4+ hücre değişimini düzenler; timusta CD8+ T lenfosit gelişiminin ana düzenleyicisi	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	6q22.33	<i>PTPRK , THEMIS</i>	THEMIS Geç timosit döneminde, pozitif ve negatif T hücre seçiminde düzenleyici rolü var	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	2q12.1*	<i>IL18RAP , IL1RL2 , IL18R1 , SLC9A4 , IL1RL1</i>	IL18RAP (IL-18 reseptörünün alt ünitesi): T hücre tarafından IFN γ üretimini uyaran sitokin; IL-18 uyarısına yanıt olarak NF- κ B ve JNK yanıtını arttıran aracı	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	3q25.33*	<i>SCHIP1 , IL12A</i>	IL12A: IFN γ 'nın T hücresinden bağımsız uyarılmasında etkin, Th1 ve Th2 hücre değişiminde görevli	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	4q27	<i>IL2 , IL21 , ADAD1 , KIAA1109</i>	IL2: T hücre büyüme faktörü; Doğal öldürücü (NK) hücre, monosit ve makrofaj aktivasyon ve proliferasyonunda ve B hücre değişiminde görevli. IL-21: Th17 cevabının arttırılması	T hücre maturasyon ve farklılaşması
ÇH	22q11.21	<i>CCDC116 , UBE2L3 , HIC2 , LOC150223</i>	UBE2L3 (ubiquitin-conjugating enzyme E2L3): p53 ubiquitinasyonu, c-Fos ve NF- κ B prekürsörünün üyesi	Doğal: NF- κ B
ÇH	2p16.1	<i>REL , PUS10 , PEX13 , AHS2</i>	REL: NF- κ B transkripsiyon kompleksinin bir parçası. AHA1: Aktivatörü sıcaklık şok 90 kDa protein	Doğal: NF- κ B
Ankiloz anSpondilit	2q31.3	<i>UBE2E3 , ITGA4</i>	UBE2E3: NF- κ B aktivitesini SUMO-1 ile birleşince negatif etkiler. ITGA4: α -subunit of integrin, lökositin adeziv ve sinyal reseptörü	Doğal: NF- κ B
ÇH	6q23.3	<i>OLIG3 , TNFAIP3</i>	OLIG3: Nöronal development. TNFAIP3: zinc finger protein, NF- κ B aktivasyonunu durdurur	Doğal: NF- κ B
ÇH	1p36.23	<i>TNFRSF9 , PARK7 , ERRF1</i>	TNFRSF9:(TNF reseptör süperailisi üyesi): T lenfosit kostimulasyonu; NF- κ B. PARK7 aktivasyonu ,oksidatif stres ve hücre ölümüne karşı nöronun korunması	Doğal: NF- κ B
Beyin Yapısı	3p21.31	<i>CCR5 , CCR3 , LTF , CCRL2 , CCR1 , CCR9 , CXCR6 , XCR1 , CCRL2</i>	Kemokin reseptör kümesi	Kemokin
ÇH	3p22.3	<i>TRIM71 , CCR4 , GBL1</i>	CCR4: Kemokine reseptör, RANTES'teki bir ligand	Kemokin
Siyah, sarı v.b. Saç rengi	6p25.3	<i>IRF4</i>	IRF4: Transkripsiyonal aktivator, IFN-stimulated response element (ISRE'ye) bağlanır TLR7 ve TLR9 sinyal yolağında görev alır; TRF4 ekspresyonu T hücre, B hücre ve makrofaj için gerekli; IL-21 aracılı aktivasyon ve Th17 hücre stabilizasyonu için gerekli	Doğal: virüs enfeksiyonuna yanıt

ÇH	6q15	<i>BACH2</i>	BACH2: B hücresinde Transkripsiyonal repressor.	Doğal: virüs enfeksiyonuna yanıt
ÇH	Xp22.2	<i>TLR8, TMSL3, TLR7, TMSB4X</i>	TLR7/TLR8: Tek zincir RNA'yı tanıma ve erken bağışıklık yanıtının başlatılmasında fundamental rol	Doğal: virüs enfeksiyonuna yanıt
ÇH	17q21.31	<i>MAPT, KIAA1267, LRRC37A, ARL17B, NSF, WNT3</i>	NSF: Vesikül-aracılı transportta görevli. WNT3: Onkogeneziste salgılanmış sinyal molekulu	Diğer
ÇH	2p14	<i>PLEK</i>	Pleckstrin: Trombosit ve lökosit C kinaz substratı; insan trombositlerinde membran yapısında görevli	Diğer
ÇH	3q28	<i>LPP</i>	LPP: Hücre dışında olup, hücre-hücre adezyonunda ve hücre motilitesinde görev alır	Diğer
ÇH	1p31.3	<i>NFIA</i>	NFIA: İnsan granulopoezisinde düzenleyici rol	Diğer
ÇH	3p14.1	<i>FRMD4B</i>	FRMD4B (FERM domain-containing protein 4B): Membranı hücre iskeletine bağlar	Diğer
ÇH	7p14.1	<i>ELMO1</i>	ELMO1: Fagositozu düzenler	Diğer
ÇH	3q26.2	<i>ARPM1, LRRC34, LRRC31, MYNN, LOC344657</i>	Bilinmiyor	Bilinmiyor

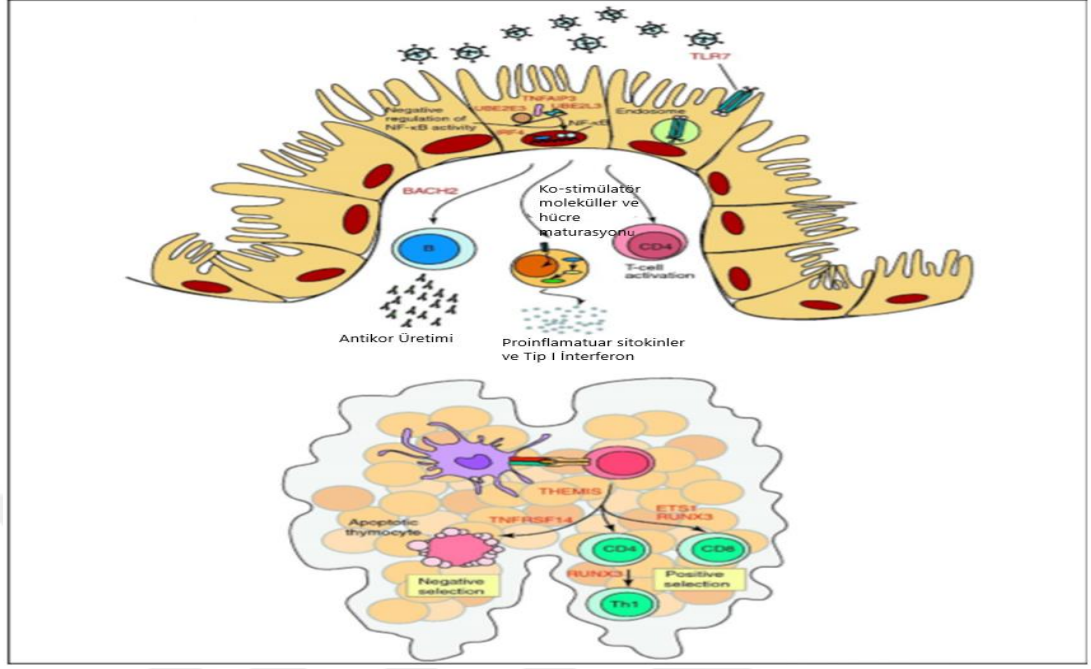
2.1.6. Çölyak Hastalığında İmmünoloji:

GWAS çalışmalarının bulguları, ÇH'da doğuştan İmmün sistemin de sebep olduğunu göstermektedir. Birçok ilişkili gen, NF-kB aktivitesini düzenlemek için görev alır. NF-kB hem doğuştan hem edinsel İmmün yanıtta, inflamasyonu sitokin üretimi ve hücre ölümü aracılığıyla düzenleyen bir transkripsiyon kompleksidir. CD4/CD8 bağlantısı ile merkezi tolerans; timusta oluşan timositler tarafından indüklenmektedir. ÇH ile ilişkili genler, timusun da patolojide rol oynadığını göstermektedir. İlişkili genler, timositleri negatif veya pozitif seçime yönlendirerek düzenleme yapmaktadır (örneğin, TNFRSF14 çift pozitif=DP timositleri apoptozise yönlendirir). ETS1 veya RUNX gibi genler, lenfosit sağkalımı için şarttır (Şekil.3).

ÇH uzun zamandır, virüs gibi bazı dış etkenlerin uyarısıyla ortaya çıkan; güçlü ve şiddetli bağışıklık cevabı, T hücresi hastalığı olarak tanındı. Bu bakış çoğunlukla, 30 yıldan fazla zamandan beri HLA ile olan genetik ilişkisine bağlanıyordu. GWAS sonuçlarına göre, spesifik bazı genlerin artık saptanabilir

oluşu, T hücresinin tetikleyicisi ve aktive edilmesi ve timusun rolü gibi pek çok olanak dahil, geniş resmi görmemize yardımcı oldu.

CTLA4, SH2B3, PTPN2 ya da CD80 genleri, T hücresi cevaplarını negatif düzenleyen faktörleri kodlarken; diğerleri T hücresi aracılığıyla gerçekleştirilen hücre apoptozunu kapsar (FASLG gibi). Çoğu Çölyak lokusu, kemokinleri etkileyen (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR9, CXCL1, CXCL6) faktörleri kodlayan genleri ve karşılığında inflamasyon bölgesine ya da lenfoid dokuya hücrel göçü yöneterek, bağışıklık cevabını düzenleyen genleri içerir. JAK/STAT işleyişini engelleyerek, başka bir gen tarafından kodlanmış SOCS1 sitokin sinyallerini olumsuz olarak düzenler. Pozitif seleksiyon sinyali gösteren SH2B3 lokusu, sitokin cevabı engelleyici faktörü kodlar. Bu gen son olarak, polisakkarit ve muramil dipeptid uyarısıyla artan ve proinflamatuvar İmmün cevap gösteren SH2B3-rs3184504*A risk allelinin taşıyıcısı olan gendir ve NOD2'de bulunmaktadır. Bu artan cevap aynı zamanda, evrimsel bir seleksiyon tarafından yönlendirilmekte olan SH2B3-rs3184504*A taşıyıcılarının, bakteri enfeksiyonlarına karşı koruduğu ileri sürülmektedir (25). Bir diğer Çölyak geni olan ICOSLG, T hücresi ve (Antijen Sunan Hücre) APC'ler arasındaki ilişkiyi engelleyen ICOS reseptörleri için ligandı kodlar. Bu yüzden ICOSLG antikoru özellikle T hücresi cevabını engeller. Bu ligand aktive edilmiş T hücrelerinde eksprese edilir ve TH17 hücrelerinin gelişimindeki IL 21 ekspresyonunu düzenler. ICOSLG kostimülasyonu IL 10 veya IFN- γ üretimine neden olur. CD247, T hücresi reseptörü CD3 kompleksinin bir parçası olan ve antijen tanınması ile aşağı-akım sinyal transdüksiyonunu birleştirmekte önemli rol oynayan zeta zincirini kodlar.



Şekil.3. ÇH'nın patogenezinin altında yatan olası mekanizmalar (23).

Bağışıklıkla ilgili hastalıklara sahip bireylerin, hastalık sahibi olmayan bireylere göre; çok sayıda T hücre ve T hücre alt kümelerinde dengesizlik vardır. Bağışıklık ile ilgili hastalıklar perspektifinden $CD4^+$ T hücrelerinin 3 adet alt tipi olduğu görülür: Th1, Th17 ve regülatör T hücre (Treg). Bu yardımcı T hücreleri özel sitokinler salgılayarak ve farklı doku inflamasyonlarına sebep olarak patojenlere karşı adaptif bağışıklık cevabını koordine eder. IL-12 ve IL-18 sitokinlerinin ikisi de Th1 hücreleri aracılığıyla IFN- γ salgısına neden olur ki, IFN- γ ÇH'da mukoza inflamasyonuna sebep olan ana sitokindir. Hem IL-12 hem de IL-18 genleri, ÇH'da farklı kromozomal bölgede bulduklarından Th1 hücreleri ile ilgili GWAS sonuçları önemli bulgular ortaya koymaktadır. Buna göre IL-18RAP ve IL-18R1 genlerini içeren 2q12.1 bölgesi ve IL-12A içeren 3q25.33 bölgesi, heterodimerik IL-12 sitokininin alt birimini kodlar. Th17 hücreleri, otoimmünite ve doku inflamasyonunun en önemli indükleyicileri olabilir (26).

Santral toleransın uyarılması ve T hücrelerinin $CD4^+$ ile $CD8^+$ dönüşümleri timusta olmaktadır. Günümüzde timusun, ÇH'nın patogenezinde rol aldığı GWAS çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (28). Örneğin THEMIS, timositlerin $CD4^+$ veya $CD8^+$ hücrelerine dönüşümü ve T hücre olgunlaşmasını düzenleyen bir proteini kodlamaktadır. Aynı şekilde ETS1 ve RUNX 3 de $CD8^+$ hücre gelişimini düzenleyen

regülatörü kodlamaktadır. Doğal İmmün yanıtın, ÇH'nın patogenezindeki rolü her ne kadar tam aydınlatılmış olmasa da; intestinal epitelin gluten molekülüne karşı IL-15 salgısı açıklanmıştır (29). Aynı şekilde enfeksiyonlar gibi dış etkenler de doğal İmmün yanıtı başlatarak ÇH'da tetikleyici olabilmektedir.

2.2.THEMIS

Herhangi bir patojene karşı koruyucu olan ve otoimmün olmayan bir T hücre reseptörünün; yaşamak, ölmek ve soyunu sürdürmek gibi gelişimsel kararlar veren olgunlaşmamış CD4⁺, CD8⁺ timositler içermesi gerekmektedir (31). Bu kararlar, hematopoetik kökenli olan ve olmayan; özelleşmiş hücreler tarafından sunulan, self-MHC tarafından indüklenen TCR sinyalleri ile yönlendirilmektedir (32). Bu temel kararlar verilirken en önemli belirleyici rol TCR sinyalinin gücündedir (33-34). Çok güçlü veya çok güçsüz sinyaller, 'Çift Pozitif'(DP) timositleri ölüme yönlendirirken; orta şiddetteki sinyaller yaşamaya yönlendirir. Soyun sürdürülmesi konusunda sinyalin süresi CD8⁺'de önemsiz olmasına karşın CD4⁺ için çok önemlidir (35-36).

Kendi peptidini sunan majör histokompatibilite kompleksi (Self-pMHC) ile güçlü bir etkileşime giren ve organ ve doku tahribatı yapan olgun konvansiyonel T hücresi (Tconv) üretebilme potansiyeli olduğu için, DP timositlerin hemen bertaraf edilmesi gerekmektedir. Aynı şekilde self-pMHC'lerden "tonic" sinyal alamayan verimsiz potansiyel T hücrelerinin de timustan ayrılması engellenmelidir. TCR intermediate bir sinyalin zararlı değil de yararlı olduğunu şu yolla anlamaktadır. Moleküler sinyalizasyon penceresinden bakıldığında, tüm bu aktiviteler ancak TCR'in ligant afinitesinin devamlılığının oranı ve frekansı ile mümkün olmaktadır. Burada asıl soru, DP timositler ve muhtemelen periferik T hücreleri sinyaldeki bu yoğunluk ve süre farklılığını nasıl algılayıp, gerekli standardize edilmiş gen ekspresyon paternini göstermektedir. Düzenleyici geri bildirim veya ileri bildirimler, TCR sinyallerinin uyum, ret veya işleyiş haline dönüşmesini sağlamaktadır. Bu mekanizmaların da hayatta kalma, soyunu devam ettirme veya apoptozis gibi ciddi biyolojik sonuçları olmaktadır. TCR ile self-pMHC arasındaki bağlantı eşiği; DP timosit için pozitif seçim demek olup yaşamını sürdürmek anlamındayken, negatif seçim ise ölüm demektir (33,37,38,39). Son çalışmalar, T hücrelerinin kaderini

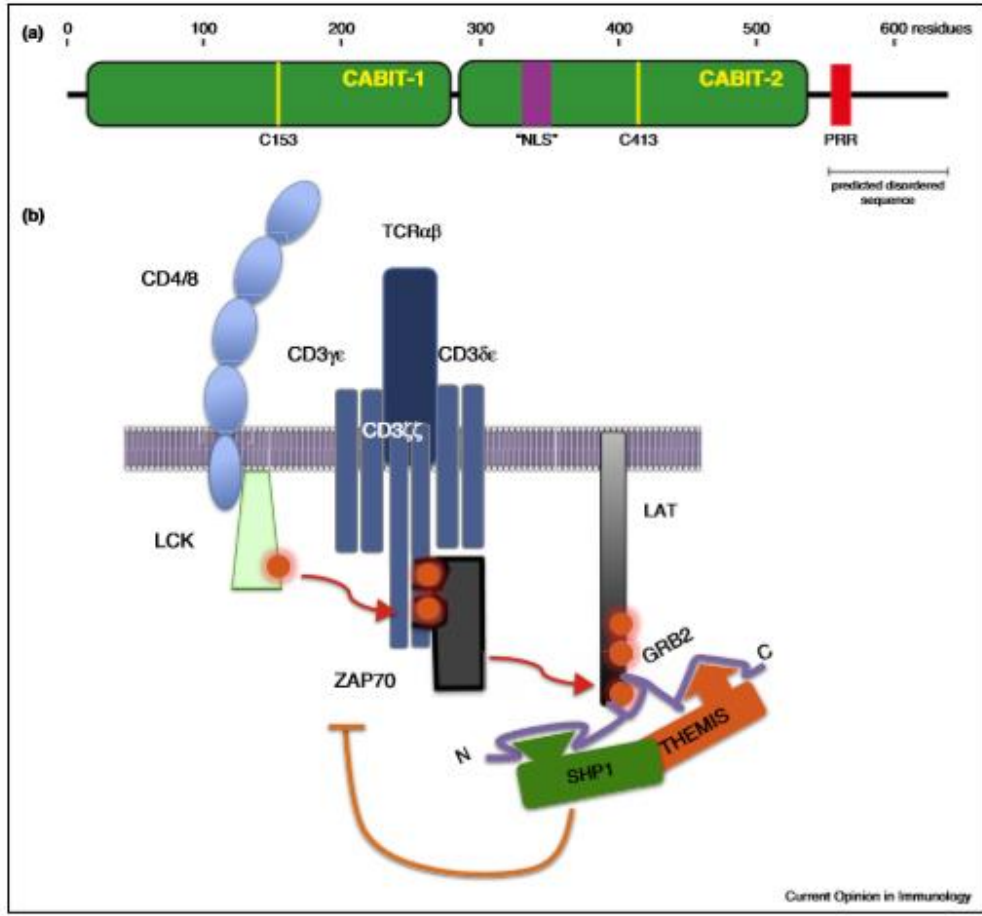
belirleyen bu TCR'ın sinyal mekanizmasında, THEMIS'in anahtar rol aldığını göstermiştir (40,41,42,43).

THEMIS, ayrıca Gasp (Grb2-ilişkili protein) olarak da bilinmektedir ki timik T hücre gelişimindeki pozitif seçimde en önemli rolü oynamaktadır. THEMIS; farklı tarama metodu kullanan (6,45,46), ileri genetik yöntemlerle (47,48) ve erken TCR-sinyal hedefli fosfo-proteomiks yoluyla (49) birçok araştırmacı tarafından izole edilmiştir. THEMIS özel olarak en çok T hücre soyunda, olgunlaşmamış DP timositlerde ve daha sonra azalarak SP timositlerde ve olgun T hücrelerinde eksprese olur. Erken çalışmalar THEMIS'in, Linker for Activation of T cells (LAT)'a bağlandığında TCR stimülasyonundan 30 saniye içinde tirozini fosforillemektedir ki bu da bize THEMIS'in TCR erken sinyal transdüksiyonunun bir parçası olduğunu göstermektedir (6,49).

THEMIS yetmezliği olan farelerde yapılan çalışmalarda, DP timosit seçiminde güçlü bir defekt sonucu, olgun CD4⁺ ve CD8⁺ tek pozitif (SP) timosit eksikliği görülür (6,45,46,47,48). Bu farelerin periferinde de olgun T hücrelerinde ciddi azalma olur ki bunların çoğu hafıza hücresi fenotipindedir. Bu veriler de THEMIS'teki kaybın, pozitif seçimde bir defekt meydana getirdiğini düşündürmektedir. Bununla beraber THEMIS yetmezliği olan timositlerde yapılan TCR sinyal kaskadı çalışmalarında, güvenilir net bir defekt bulunamamıştır. Birçok çalışma hiçbir bulguya rastlamazken (45,46,47), bir çalışmada sadece TCR'nin antikorla çapraz bağlanmasından sonra Ca⁺⁺ ve ERK (Extracelüler sinyalle regüle kinaz) sinyallerinde küçük düzenlemeler görülmüştür (30). Bu belirsizlik bazı araştırmacılara THEMIS için, T hücre gelişiminin sadece metabolik yolunda düzenleyici olarak dahil olduğunu düşündürmüştür (47). THEMIS ekspresyonu siRNA tarafından durdurulmuş Jurkat hücrelerinde yapılan ilk çalışmalarda; antikor aracılı TCR stimülasyonu ile IL2 gen ekspresyonu ve ERK fosforilasyonunda ılımlı bir düzenleme bulunmuştur (49). Takip eden çalışmalarda (51), THEMIS'te prolin zengin bölge haritalanmış ve birçok çalışmayla da buranın GRB2 (Büyüme faktörü reseptörüne bağlanan protein 2) bağlanmasına cevap verebilecek yapıda olduğu gösterilmiştir (45,46,47,49) (Şekil.4). THEMIS, LAT'a bağlandığında in vivo fonksiyon gösterebilmek için hem GRB2 düzenlemesine hem de LAT fosfotirozin

GRB2 bağlanma bölgesine ihtiyaç duymaktadır (51). Diğer araştırmacılar, prolinden zengin bölgenin nükleer yerleşimli bir site olduğunu ama fonksiyonunun ne olduğunu bilinmediğini açıklamışlardır (52,53).

Bu veriler, THEMIS'in TCR tetikleyicisinin yanındaki LAT'a bağlandığında negatif feedback mekanizmasını çalıştırdığını göstermekte ancak bu etkiyi THEMIS'in tek başına mı yaptığı ya da başka bilinmeyen bir molekülün desteğiyle mi olduğu net değildir. Mass spektrometri (MS) temelli THEMIS interaktom çalışmaları; GRB2 ilavesiyle THEMIS'in Tirozin fosfataz 1 ve 2 (SHP1 ve SHP2) ile yapısal olarak ilişkiye girdiği tespit edilmiştir (55). MS verileriyle bağlantılı olarak normal T hücrelerinde ve timositlerde yapılan, co-İmmünopresipitasyon deneyleri, THEMIS'in asiste ettiği SHP proteinlerinin sinyalleri zayıflattığını düşündürmüştür (34,54,55). SHP1'in yok edildiği primer T hücrelerinde ve Jurkat hücre hattında arttırılmış TCR sinyalizasyonunun; THEMIS ile ilişkilendirilen SHP fonksiyonu olduğu anlaşılmıştır (55). Erken dönemdeki çalışmalarda da zaten SHP1'in, TCR proksimal atenuatörü olduğu saptanmıştır (56,58).



Şekil 4. TCR sinyalinin THEMIS aracılı mekanizmayla zayıflatılması (30). a) THEMIS'in yapısı. CABIT domeyn (cysteine-containing, all-b in THEMIS) yeşil olarak görülmektedir, sistein rezidüleri sarı, NLS (Nuclear Localization Site) mor ve PRR (Prolin Rich Region) portakal rengindedir. b) THEMIS-GRB2-SHP1 (veya SHP2) kompleksi T hücre ve timositlerde denge durumundadır. GRB2, THEMIS'i SHP'ye; C-SH3 ve N-SH3 ile bağlarken boşta kalan SH2 ucu LAT'ın sonundaki C terminalde bulunan GRB2 pY bağlanma sitesine tutunur. THEMIS, LAT ile birleştiğinde hızlıca lenfosit spesifik protein triozin kinaz (LCK) ve/veya ZAP70 tarafından fosforile edilir. TRC ise LCK'yı defosforile ederek, SHP aracılığıyla sinyali zayıflatır.

THEMIS ve SHP birbirine GRB2 denen bir aracıyla bağlanmaktadır (51-55). GRB2'nin N-SH3 domaini SHP1 ile bağlanırken, C-SH3 domaini THEMIS ile bağlanmakta ve GRB2-SH2 domaini de LAT'a bağlanmaktadır ki THEMIS'in in vivo fonksiyonu için bu konfigürasyon şarttır (51). Fosfotirozinin bağlanması konusu ise henüz aydınlanmamıştır.

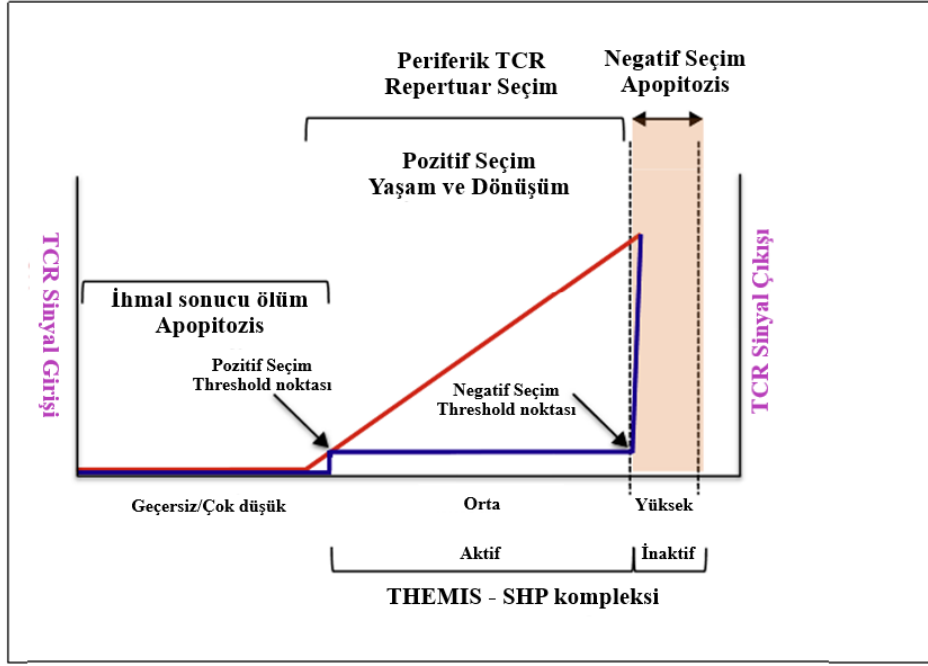
Burada, korunmuş sistein rezidüsü ve bilinmeyen bir hayvansal protein içeren ve "CABIT" denen bir birim, tanımlamaya çalışılmaktadır. Ethyl nitrosourea (ENU)

ile oluşturulmuş ve fark edilmeyen mutasyon olan T hücrelerinde THEMIS, DP T hücrelerinin SP hücrelerine dönüşümünü gerçekleştirememektedir.

Önceki çalışmalar, TCR'nin pMHC'ye zayıf bağlanması ve LCK'nın kendi SH2 domeniyle fosforile SHP1'e bağlanması, TCR sinyalini azaltır (59). Dahası ERK'nın güçlü bir şekilde pMHC-TCR angajmanı ile aktive olması; LCK'yı fosforile ederek SHP bağlanmasını bloke eder. Bunun gibi ikili negatif feedback mekanizmaları, uyarılar arasındaki ayrışmayı yapabilecek iyi bir eşik oluşturur (59). Ancak THEMIS-SHP tarafından oluşturulan negatif feedback (54-55), bu model için konsept olarak basit kalmaktadır (60) ve THEMIS-GRB2-SHP kompleksinin LCK'ya bağlanmasını kontrol edemeyeceği (59) yazılmaktadır.

TCR sinyalinin özgünlüğü, "kinetik bir düzeltme" mekanizması tarafından yürütülmektedir ki; görece olarak TCR-pMHC bekleme süresindeki küçük farklılıklar bile sinyal devreleri tarafından algılanmakta ve hızlı bir şekilde, çok sayıda, reversible olaylarla yanıt vermektedir (40).

THEMIS eksikliği olan BN farelerde barsak lezyonları Crohn Hastalığına benzemektedir (44). Duodenumdan distal kolona kadar etkilenen gastrointestinal traktus; yama tarzında submukoza ve kas tabakasının inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonu ve sıklıkla granümatöz yapıların olduğu bir histolojik görüntü sergilemektedir. Bu görünüm Crohn ile uyumludur. Buna karşılık Crohn'un aksine burada yüzeysel mukoza zararı, diyare ve kusma yoktur.



Şekil 5. Timosit seçilmesi esnasında, TCR sinyalinin THEMIS-SHP kompleksi üzerinden çalışma modeli (30).

2.3. RUNX Ailesi:

RUNX proteinleri, Runt-ilişkili domeyni; DNA'ya bağlanmak ve CBF β (Kora bağlanan faktör β) partneri ile heterodimerizasyon için evrimsel olarak korunmuştur (61). RUNX proteinleri, farklı metazoa ve memelilerde RUNX 1, 2 ve 3 olarak bulunur. Bazı yayınlarda; AML1/3/2, PEBP2aB/A/C, CBFa2/1/3 olarak da geçer. RUNX genleri memelilerde, P1 (distal) ve P2 (proksimal) olmak üzere iki farklı promotor içerirler. Bunların farklılığıyla RUNX izoformları oluşur (61). Lökomojenik kromozomal translokasyonun sıklıkla hedef aldığı RUNX 1, ilk olarak insan Akut Myelojenik Lösemiden izole edilmiştir (62). RUNX 1, Hematopoetik kök hücrelerin (HSC) üretim ve bakımı için gerekli olduğu gibi aynı zamanda farklı hematopoetik soyların farklılaşması için de şarttır (63). RUNX 2 osteoblast farklılaşması için ana düzenleyici olup, kemik ve kıkırdağın gelişim ve bakımı için de gereklidir (64). RUNX 2'nin DNA'ya bağlandığı Runt-domeynindeki geniş mutasyon ile ortaya çıkan haplo yetmezlik sonucu insanda *cleidocranial dysplasia* meydana gelir (61). RUNX 3'ün ekspresyonu, TrkC-pozitif dorsal kök gangliyon nöronlarının farklılaşması için gereklidir ve epitelyal dokularda çok yaygın

gözlenmektedir (61). RUNX 3, tüm hematopoetik soyda ve RUNX 1'den farklı olarak eksprese olur. RUNX 2'nin hematopoetik sistemdeki ekspresyonu az çalışılmıştır, buna karşın CBF β izoformları tüm dokularda yaygın olarak eksprese olmaktadır (65,66). Sonuç olarak, hematopoeze ve hücre olgunlaşmasına yaygın olarak katıldıkları gibi; İmmünolojinin tüm evrelerinde de yer almaktadır. RUNX proteinlerinin, host (ev sahibi) immünolojisinde daha önemli rol oynadıkları bilinmektedir.

2.3.1-RUNX ve Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik Kök Hücreler (HSC), tüm hematopoetik soyların türediği multipotent kök hücrelerdir. Gelişimsel olarak memelilerin hematopoetik sistemi üç döneme ayrılır:

- (i) embriyogenez esnasındaki primitif hematopoez
- (ii) geç fetal gelişimde olan kalıcı hematopoez ve
- (iii) yetişkin hematopoez.

RUNX'in hematopoezdeki önemi, RUNX 1 olmayan farelerde hematopoezin tamamen olmadığı görülmeleriyle anlaşıldı. RUNX 1'in tamamen kaybı durumunda; mezonefron bölgesinde, gonad ve aortada bulunan hemojenik endotelial hücreler arasındaki HSC'in geçişi tamamen durmaktadır (67,68). RUNX 1 ayrıca erişkin hematopoezde HSC'nin biyogenezisi için değil ama bakımı için de gereklidir.

Bazı çalışmalar, yetişkin farelerin kemik iliğindeki HSC'lerin Mx1-Cre ile hedef alınıp zarar verilmesi durumunda; T ve B lenfositlerde defekt ve bazılarında da megakaryosit olgunlaşmasında blokaj olduğu görülmüştür (69,70). Bazı çalışmalar, RUNX 1 eksikliği olan HSC'lerin başlangıçtaki artışlarının; açıklanamayacak şekilde sonradan tükenişe sebep olduğunu göstermektedir (69,71). Bu paradoksal fenotipin, CXCR4 kemokin reseptörünün yanlış regülasyonu sonucu; HSC'nin hücre sel nişten erken ayrılması ile meydana geldiği düşünülmektedir (71,72). HSC'deki bu defekt, eğer RUNX 3'te de hata varsa çok daha barizdir ki bu da RUNX proteinlerinin HSC bakımından örtüşen fonksiyonları olduğunu göstermektedir (73).

RUNX 1, Kemik iliğinde RUNX 3 delesyonu ile beraber olduğunda; daha derin farklılaşma yaratarak bütün hematopoetik soylarda ilerleyici hastalıklara neden olmaktadır. Kemik iliği yetmezliği ve myeloproliferatif hastalıklar bu şekildedir (73). Aynı şekilde, CBFβ'nin panhematopoetik delesyonu sonucu, bütün hematopoetik türlerde ciddi bozulmuş farklılaşma ile myeloid hücrelerde proliferatif hastalıklara neden olur (74,75). İlginç olarak Mx1-cre ile hedef alınmış CBFβ eksikliği sonucu ortaya çıkan kemik iliği yetmezliği, RUNX 1-RUNX 3 duble yok edilmiş farelerdeki kadar öldürücü değildir. Bu da RUNX 1 ve RUNX 3'ün CBFβ bağımlı DNA tamirindeki görevini göstermektedir (73).

2-3-2- RUNX'in Timosit Farklılaşmasındaki Rolü

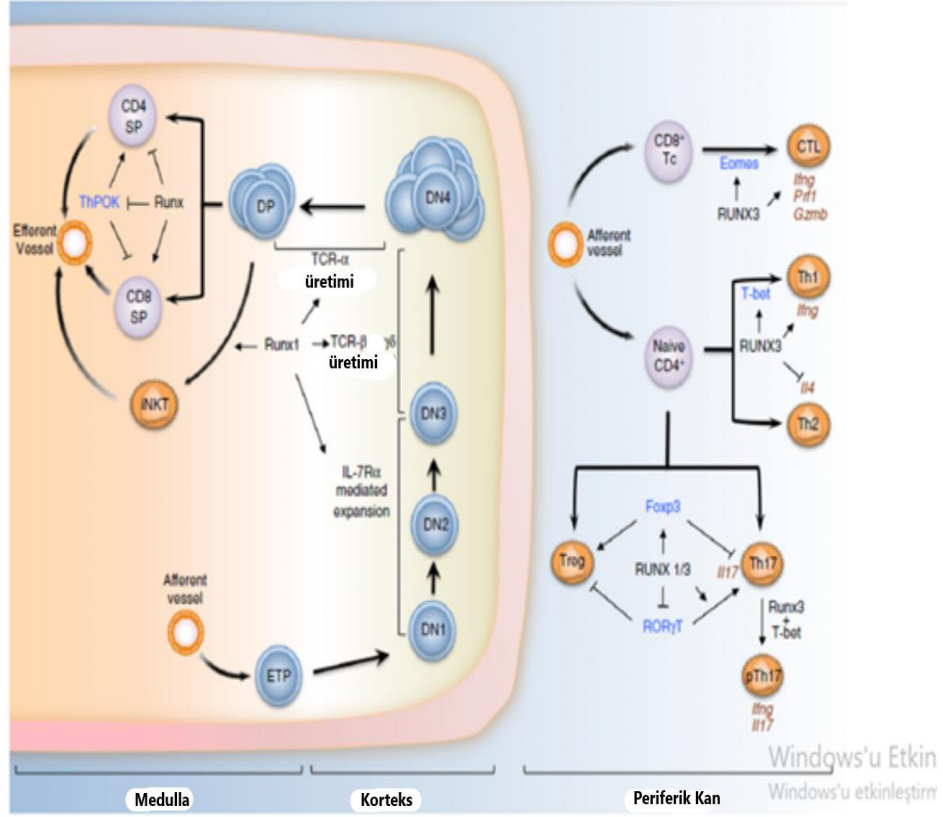
RUNX'in İmmün fonksiyonlara olan en büyük etkisi, fareler üzerinde de tespit edilmiş olan, T hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşmasını sağlamasıdır (76). T hücre gelişiminin tüm aşamalarında RUNX proteinleri, farklılaşma düzeyi ve farklı gelişim paternleriyle örtüşecek şekilde eksprese olmaktadır. RUNX proteinlerinin ekspresyonu, hematopoetik sistemin ötesinde timik epitelyal hücrelere kadar uzanır. RUNX 1, en fazla timik kortekste eksprese olur. Çünkü CD4 ve CD8 çift negatif (DN) burada yoğundur (65,77,78). Bundan sonra RUNX 1, CD4⁺-CD8⁺ çift pozitif (DP) ve CD4⁺-CD8⁺ tek pozitif (SP) hücrelerde, CD4⁺ SP hücrelerde daha yüksek olmak üzere, eksprese olmaktadır (78,80).

Bu çerçevede, kemik iliğinde RUNX 1'in Mx1-Cre ve timositlerin Ick-Cre tarafından hedef alınması sonucu DN3 ve DN4 timositlerin sırasıyla olgunlaşması bloke edilmektedir. Dahası, RUNX 1'in Cd4-Cre ile ablasyonu sonrası DP'den SP'ye dönüşümü kesintiye uğramaktadır (69,79). Bu süreçler insan ve farelerde; RUNX 1'in TCR-cd ve TCR-ab'deki yeniden dağılımıyla çakışmaktadır (Şekil 6) (81,83). RUNX 1, TCR zincir hızlandırıcılarından uyumlu olanına bağlanarak TCR yeniden dağılımını yönetmektedir ki bunu insanda; Rekombinasyon aktivasyon geni 1 (RAG1) ile fiziksel etkileşimle, Dd2'den Dd3'e yeniden dağılımı sağlamaktadır (84). Kolektif olarak bu çalışmalar, RUNX 1'in erken T hücre gelişiminde anahtar rol oynadığını göstermektedir.

RUNX 1 ile karşılaştırıldığında RUNX 3 geç T hücre farklılaşmasında önem kazanmaktadır. Olgunlaşmamış CD4⁺ ve CD8⁺ DP hücrelerden CD8⁺ sitotoksik T hücre farklılaşmasında dominant rol oynamaktadır. Bunu bir seri mekanizmayla yapmaktadır. Bu mekanizmalardan birincisi RUNX 3 ve RUNX'in, CD4 lokusundaki susturucu elemente bağlanarak onun eksprese olmasını engellemesidir (79,85). İkincisi, CD4 soyunu sürdürmekte anahtar rolü olan Thpok susturucu elementine bağlanmasıdır (85). RUNX 3 ayrıca, TCF-1 ve LEF-1 gibi CD4 ve Thpok'u regüle eden transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini de düzenler (86). Son olarak RUNX proteinlerinin CD4 ve CD8 lokuslarına bağlanması; onların ilişkilerini teşvik eder ve karşılıklı ekspresyon paterninin altında yatan uzun mesafe epigenetik düzenlemeye fırsat verir (87). Bu önemli fonksiyonları düşünüldüğünde, RUNX kompleksinin genetik ablasyonu; CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerin farklılaşmasının blokajı ve CD4⁺ CD8⁻ fenotipine farklılaşmaya yönlendirmektedir (79,85).

2.3.3- Efektör T Hücre Alt Türlerinin Farklılaşmasında RUNX'in Rolü

RUNX 1 ve RUNX 3, çevresel etkenlere maruziyet ve TCR aktivasyonu sonrası naif CD4⁺ T hücre olgunlaşma sürecine dahil olmaktadır. Yapılan detaylı çalışmalarda RUNX proteinleriyle, primer soy-spesifik transkripsiyon faktörleri arasında fonksiyonel kooperasyon olduğu gözlenmiştir (88). T helper tip 1 (Th1) farklılaşması esnasında; RUNX 1 ekspresyonunun düzenlemesiyle RUNX 3 ekspresyonunda artış görülmektedir. RUNX 3 yetmezliği olan farelerde, Th1 farklılaşması ve sitokin üretimi değişmiştir (89). RUNX 3, Cd4'ü susturup Cd8'i aktive ettiği dualistik etkisini yapabilmek için; Th1 fenotipini güçlendiren, Th1-

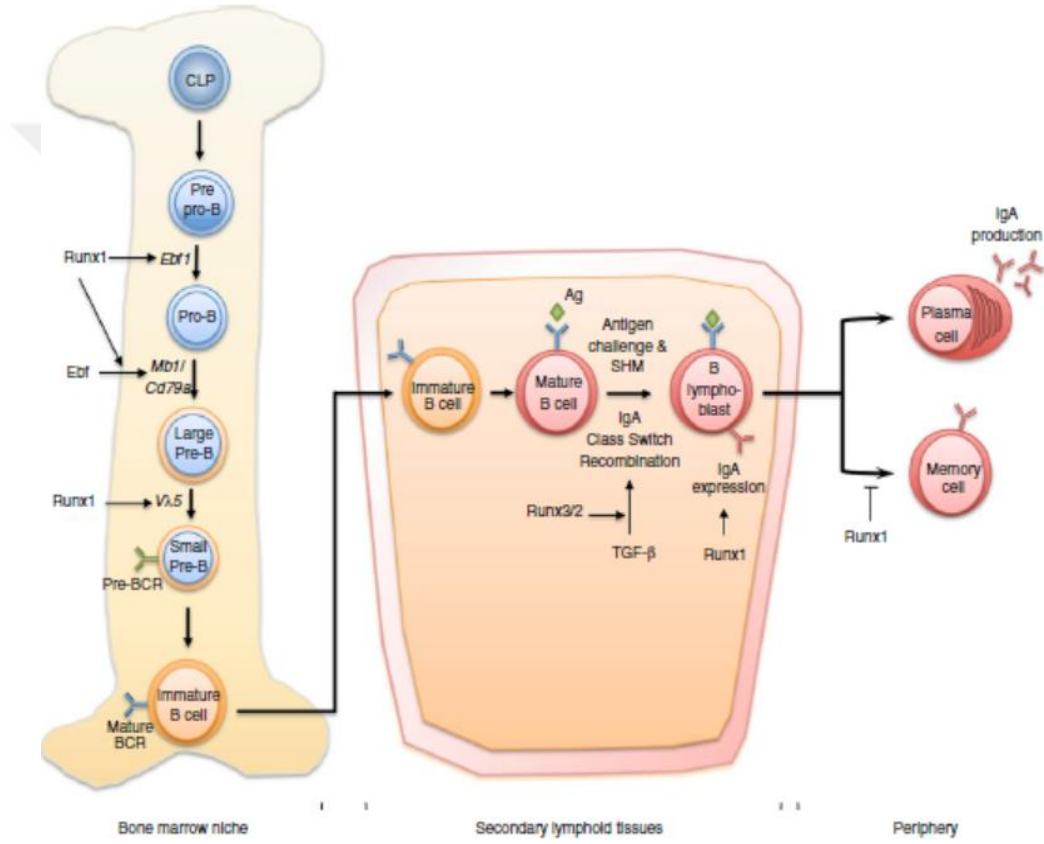


Şekil 6. RUNX ve T lenfosit farklılaşması (173)

transkripsiyon faktörü olan T-bet ile koopere olmaktadır. RUNX 1 ile birlikte RUNX 3, Th1'in damgası olan sitokin $IFN\gamma$ 'yı aktive ederken; Th2-spesifik sitokini olan IL-4'ü baskılamaktadır (89,91). Ayrıntılı çalışılmamış olmasına rağmen, Th2 spesifikasyonu esnasında ortaya çıkan RUNX 1 artışına karşılık RUNX 3 azalışında; RUNX 1'in rolü olduğu düşünülmektedir (89,90).

Regülatör T hücreleri (Treg), timusta kendiliğinden veya transforming growth factor β (TGF β), IL-2 ve diğer periferden gelen sinyallerle uyarılarak CD4 ve CD25 eksprese edebilir (92,93). Treg fenotipi, transkripsiyon faktörü Foxp3 tarafından oluşturulur. RUNX proteinleri, nTreg hücreleri içinde Foxp3 ekspresyonu ve iTreg farklılaşması sırasındaki uyarı için şarttır (94,97). Gerçekten de IL-2'nin üretimini içeren Treg genetik programının devamlılığı için RUNX proteinleri, Foxp3 ile fiziksel olarak iletişim içindedir (94,97,98). Sonuç olarak, koşullar nedeniyle RUNX 1, RUNX 3 veya CBF β 'nin bulunmadığı farelerde; nTreg ve iTreg farklılaşması, yaşaması ve fonksiyonu güçlü bir şekilde sekteye uğramaktadır (94,96).

RUNX/CBF β yetmezliği nedeniyle Treg hücrelerinde defekt meydana geldiğinde; lenfoproliferatif sendromu ortaya çıkar ki, IgE'nin aşırı üretimi ve akciğer, mide gibi organ mukozalarında otoimmünite görülür (94,95). Bu durum, birçok RUNX 3 yetmezliği olan fare modellerinde bildirilen ve Dendritik hücrelerin (DC) spontan olgunlaşmasına bağlanan, gastrointestinal ve akciğer inflamasyonunu açıklamaktadır (99,100).



Şekil 7. B hücre gelişiminde ve humoral immünitede RUNX (173)

iTreg hücrelerini uyaran TGF β , ek olarak, inflamasyonun güçlü bir medyatörü olan Th17'nin de farklılaşması için şarttır (93,101,102). Bu durum, eş zamanlı olarak IL-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinleri uyarmasına bağlıdır (103). Ayrıca Th17 hücreleri; mukozal yüzeylerde bakteri ve mantarlara karşı direnç geliştirilmesinde, dereğülasyon ve hiperaktivitesinde de otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasında çok etkilidir (101-104). RUNX proteinleri TGF β medyatörleri için ne kadar önemliyse; aynı şekilde Treg ve Th17 hücrelerini eş zamanlı olarak uyarması da o kadar ayrıntılı

incelenmelidir (93,102). Foxp3'ü düzenledikleri gibi RUNX proteinleri, Th17'ye özel ROR γ t transkripsiyon faktörünü yükseltmektedir (105,106). Ayrıca RUNX proteinleri, DNA'ya bağlanma aktivitelerinden ayrı olarak, IL-17'yi maksimum uyarmak için ROR γ t ile fiziksel olarak da iletişime geçerler (106). Foxp3 ayrıca IL-17 transkripsiyonunu baskılamak için ROR γ t ile etkileşime geçmektedir (106). Yani, Th17 spesifikasyonu ve efektör fonksiyonu için RUNX, Foxp3 ve ROR γ t arasında üçlü bir ilişki gerekmektedir (106). Th17 ilişkili otoimmün inflamasyonda asıl sorumlunun; yüksek düzeyde IL-23 reseptör (IL23R) ekspresyonu ve normalde Th1 ürünü olan IFN γ üretimi ile karakterize Th17'nin patojenik bir alt türüdür (107). Son olarak Th17'nin patojenik IL23R tarafından IFN γ üretimi, Tbet ve RUNX 1 3 gerektirmesi nedeniyle; RUNX proteinlerinin önemli otoimmün hastalıkların patogenezinde rol aldığı kesindir (108). Bununla uyumlu olarak, artmış RUNX 1 ve azalmış RUNX 2 düzeyleri, salt-uyarılmış patojenik Th17 ile ilişkilidir (109,110).

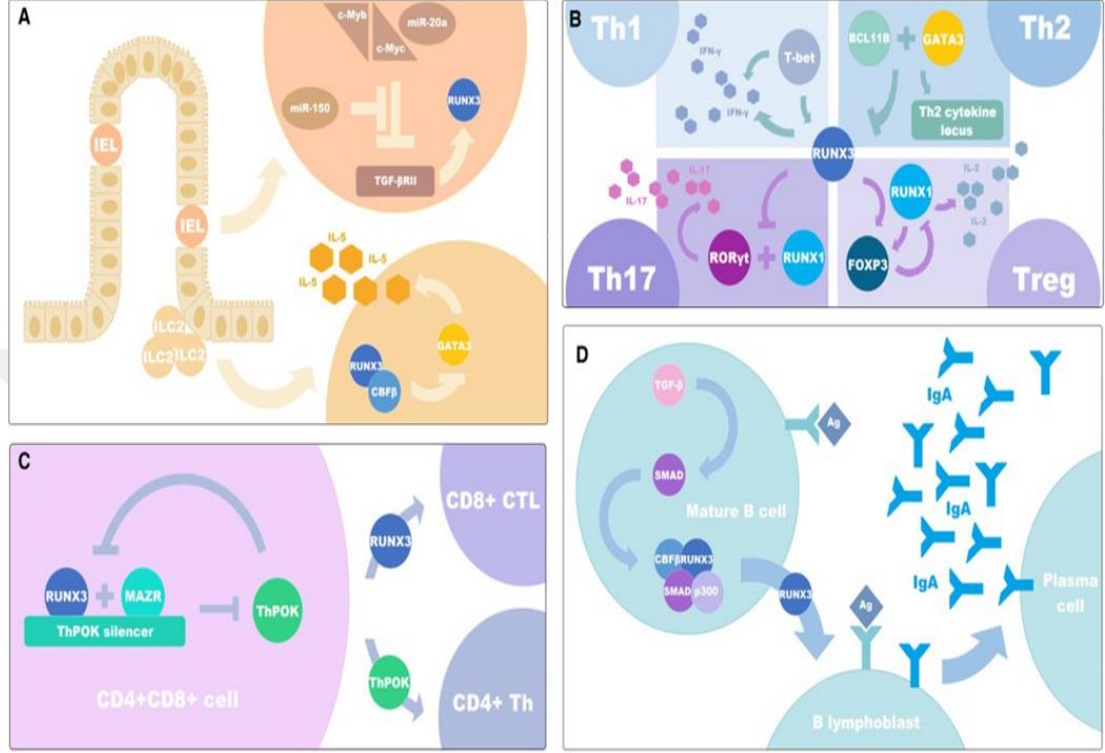
İntestinal mukozada, TGF β ve retinoik asit gibi güçlü çevresel faktörler nedeniyle T hücre farklılaşmasındaki yetmezlik ve CD4⁺ T hücre soyunun esnekliği sayesinde; mevcut homeostasis, komensal mikrobiyanın abartılı cevaplarından korunarak sürdürülmektedir (111,112). İntestinal epitelyal lenfositlerin (IEL) progenitörlerinin, intestinal intraepitelyal alana göçü esnasında CD4⁺, CD8⁺ düzenleyen IL-15 uyarısıyla RUNX 3 ekspresyonunda olmaktadır (113,115). Dahası RUNX 3 CD4⁺lara IEL sitotoksik T lenfosit ve doğuştan benzeri lenfosit özellikleri kazandırırken; TGF β ve Retinoik asit birbirleriyle ilişkili olarak Th17 farklılaşmasını zayıflatmaktadır (114). SP CD8⁺ sitotoksik T hücrelerinin TCR ilişkili ekspansiyonu ve farklılaşmasında RUNX mecburiyeti ufuk açıcı bir buluş olmasına karşın; olgun CD8⁺ T hücrelerinde RUNX proteinlerinin efektör görevi konusunda daha fazla çalışmaya gerek vardır (79,85,117). Yine de RUNX proteinleri, transkripsiyonel döngünün soya spesifik integral komponentidir. Ayrıca RUNX 3, sitotoksik T hücrelerin (Tc/CTL) farklılaşması esnasında T-box proteini olan Eomesodermin (Eomes)'in indüksiyonu için de gereklidir. RUNX 3 yetmezliği olan CD8⁺ Tc hücreleri, zayıflamış TCR indüksiyonlu proliferasyon (79,82) ve granzim, perforin ve IFN γ içeren Tc efektör genlerin düşük ekspresyonu nedeniyle (91), azalmış sitolitik aktivite gösterirler. RUNX ayrıca, CD1d-kısıtlıya özelleşen ve TCR- $\alpha\beta$ 'a ve NK1.1 (CD161) gibi NK olgunlaşma markırlarına ekspresyon alan doğal öldürücü T

hücre (NKT) gelişiminde çok önemlidir (118,120). Aynı şekilde RUNX 1, ROR γ t ile birlikte; değişmez TCR- α zinciri olan NKT hücrelerinin alt grubu olan iNKT farklılaşmasında vazgeçilmezdir (116). Bu değişmez NKT hücreleri, otoimmünite, mikrobik İmmünite, sitokin üretimi, İmmün regülasyon gibi farklı İmmünolojik süreçlerde görev almaktadır (118,121,122). NKT eksikliği olan Cre farelerinden de anlaşıldığı gibi, NKT hücrelerinin fonksiyonlarını; RUNX kompleksinin kesin dağılımı belirlemektedir. Son olarak RUNX 3, dendritik morfoloji gösteren, farklı bir deri-ilişkili CD T hücresi olan Dendritik Epidermal T hücre (DETC) gelişiminde de kritik görev almaktadır (123). RUNX 3, hücre proliferasyonu ve timik DETC'nin geç fetal gelişim döneminde deriye göç etmesinde uyarıcı olan IL-2/IL-15'e aracılık eden IL-2R β ve CD103'ü regüle etmektedir (123,124). DETC, kutanöz İmmünite ve homeostazda majör komponent olduğu için, RUNX 3 eksikliği olan farelerdeki tam yokluğu sonucu; tamir mekanizması, sürveyans ve İmmün düzenlemenin nasıl olduğunun araştırılması gerekmektedir (123,125).

2.3.4- B Hücre Kararlığı ve Fonksiyonlarında RUNX'in Rolü

RUNX proteinlerinin B-hücre fonksiyonundaki rolü, ilk olarak; RUNX 3'ün, TGF β tarafından desteklendiği germline İmmünoglobulin α 'nın uyarılması için Smad proteini ile koopere olduğunun tespit edildiği, bir seri in vitro ve ex vivo çalışmayla ortaya çıkarılmıştır (126,128) (Şekil 7). Bu durum, antijen tarafından aktive edilen naif B hücrelerinin IgA sınıfını tetikleemesinin anahtar basamağıdır. Bu gözlemle uyumlu olarak, RUNX 3 yetmezliği olan splenositlerde; hem ex vivo hem in vivo olarak değişen derecelerde tetikleme defekti görülmektedir (128,129). RUNX 3'e ek olarak RUNX 1 de, farelerde erken B hücre soyu spesifikasyonu için gereklidir. RUNX 1 ve CBF β 'nin (RUNX 3 değil ama) mb1-Cre tarafından bloke edilmesi sonucu, erken dönem B lenfopoezi de bloke olmaktadır. Tam net aydınlatılmamış olmasına rağmen RUNX 1, pre B hücre reseptörü gibi daha çok erken dönem B hücre spesifikasyonunda anahtar rol oynamaktadır (130,131). Tam tersi RUNX 3 ise geç dönem B hücre farklılaşmasında görev alır. Buna örnek, fare B hücre bandında RUNX 3'ün güçlü uyarısı olarak; IgA tetiklemesi sırasında görülen naif B hücrelerin TGF β ile efektör B hücrelerine farklılaşması verilebilir (126,127,132). Sonuç olarak, RUNX 1 olgunlaşmamış ve farklılaşmamış B hücrelerinin varlığı için gerekli iken;

RUNX 3 ve RUNX 2'nin ekspresyonu, effektör T hücrelerinin terminal özelleşmesi sırasında gözlenmektedir (134).



Şekil 8. İmmün yanıtta RUNX 3. A) İntraepitelyal Lenfositlerde B) T helper C) NK hücreleri D) B Lenfositlerin gelişiminde (168)

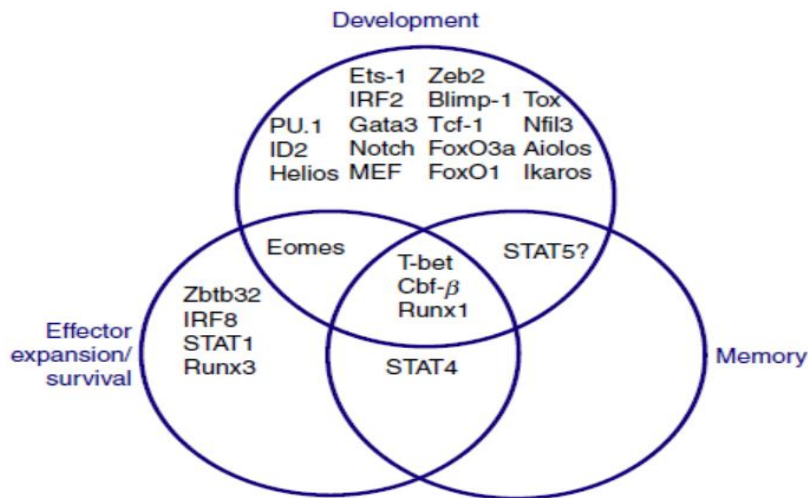
2.3.5-Lenfoid Organogenezde RUNX'in Rolü

RUNX/CBFβ kompleksi, Lenfoid Doku İndükleyici hücrelerin (LTi) gelişiminde görev almaktadır (120). Bunlar RORγt ve IL-7Rα eksprese ederek başlangıç Lenfoid hücrelerin özelleşmesini sağlar. Peyer plakları, lenf nodları gibi sekonder lenfoid dokuların biyogenezinde merkez rol oynarlar (135). RUNX 1'in izoformu olan RUNX 1c, P1 promotordan türetilmiştir ve CBFβ2, LTi diferansiasyonunun iki gelişim basamağında yer almaktadır (120). Özel olarak RUNX 1c/CBFβ2 LTi farklılaşmasının erken aşamasında ve lenf nodu formasyonunda görev alır ki bu görevlerini RORγt regülasyonu yoluyla yapar (120).

2.3.6- NK Hücre Gelişiminde RUNX Proteinleri

NK hücreleri, sitotoksik lenfosit soyunun farklı bir alt grubu olan ve doğuştan İmmünette önemli rol üstlenen, ağırlıklı olarak viral enfeksiyonlarda ve tümör hücrelerine karşı etkili hücrelerdir (136). MHC molekülleri ve antikor olmadan,

hedef hücreleri tanıma kabiliyetine sahip eşsiz hücreler olup; İmmün tanıma ve self tolerans reseptörlerine dayanarak bu fonksiyonlarını yerine getirmektedir (137). NK hücreleri; dalak, fetal ve yetişkin karaciğeri, kemik iliği ve timüs gibi birçok yerde geliştirilmektedir. Bunların farklılaşması, NK progenitör üzerinden; IL-15 uyarısıyla ve CD122 (IL-2/IL-15 reseptör β zinciri) ekspresyonuyla meydana gelir (136). RUNX'in NK hücreleri üzerindeki etkisi, ilk olarak hipomorfik CBF β fare modellerindeki erken dönemde NK farklılaşma evresindeki blokajla gözlenmiştir. Düşük doz CBF β uygulandığında, fetal karaciğer hücrelerinde derin bir defekt meydana gelmekte ve ex vivo hücre kültüründe; NK1.1, CD122⁺ NK progenitör hücre geliştirme yeteneğinin kaybolduğu gözlenmektedir (138,139). Bu durum muhtemelen, RUNX aracılığıyla CD122 transkripsiyonunun yapılamaması sonucu; IL-15 destekli genetik programın bloke edilmesi ile ortaya çıkmaktadır (140). Mutant farelerde RUNX proteinlerinin, NK progenitör hücrelerde CD122 promotörü regüle ettiği gösterilmiştir (140,141). Ancak farklı çalışmalar RUNX'in NK hücre gelişimi ve fonksiyonunda vazgeçilebilir olduğunu gösterirken; NK olgunlaşmasında esas rolün IL-15'te olduğu in vivo ve ex vivo olarak gösterilmiştir (142). Ancak aynı çalışmada RUNX kaybı, total olarak IL-15 kaybına neden olduğundan hamile farelerde, fetal ölüme sebep olmuştur (140) fakat mevcut fare modellerinin sınırlılığı nedeniyle, RUNX'in IFN γ veya tümör İmmünitesi kadar, NK fonksiyonları için gerekli olup olmadığı tam çözülememiştir.



Şekil 9. NK hücre gelişimi, efektör hücre ekspansiyon ve canlılığı ile hafıza hücre tipine dönüşmesinde etkili olan; transkripsiyon faktörlerini gösteren Venn diagramı (166).

2.3.7- Myeloid Hücre Özelleşmesinde ve Fonksiyonlarında RUNX'in Rolü

Myeloid hücre gelişimi ve fonksiyonunda RUNX'in dağılımı ile ilgili nispeten daha az bilgi vardır. İlk fare çalışmalarında, erişkin hematopoetik kök hücrelerindeki (HSC) RUNX 1 delesyonu; megakaryosit maturasyonunda ciddi bozukluk gösterirken, eritrosit, monosit, nötrofil gibi diğer myeloid seride farkedilebilir bir hata göstermedi (69,70). Bu nispeten hafif fenotip, muhtemelen myeloid farklılaşmadaki RUNX proteinlerinin aralarında var olan farklılıkları nedeniyle olmaktadır (73,75). Gerçekten de bütün RUNX proteinlerini bozan Vav1-iCre ile CBF β hedef alındığında; tüm hematopoetik sistemde daha net fenotipler gözlenmiştir. Bu durum; intestinal lamina propria, akciğer gibi periferik dokularda ve dalakta klasik ve plazmasitoid DC düzenlemesinin yönetilmesiyle meydana gelmektedir (74). Kemik iliğinde eritroid progenitör olan Flt3⁺DC'nin gelişimi için CBF β gereklidir (74). Daha ayrıntılı çalışmalarda, CBF β yıkılmış DC fenotipinde birincil sürücü RUNX 1 iken; RUNX 2'nin geç DC maturasyonunda minimum görevi olduğu saptanmıştır. Buna karşılık RUNX 3'ün hiçbir fonksiyonu tespit edilmemiştir (74,100,129). Bu tutarsızlığa rağmen, RUNX 3; erken embriyogenezdeki myeloid progenitörlerden gelişen farklı bir cilt epidermal DC olan Langerhans hücreleri için gereklidir (129,143). Burada RUNX 3, TGF β uyarısıyla Langerhans hücre farklılaşmasını sağlayan PU.1'i aşağı yönlü düzenlemektedir (143). DC farklılaşması ve olgunlaşmasına ek olarak RUNX 3, in vitro olarak CD11c ve kemokin ekspresyonunu da düzenlemektedir (144). DC kazanılmış İmmün yanıtın ve self toleransın santral koordinatörü olduğu için; onları farklılaştıran RUNX proteinlerinin de İmmün sisteme etkisi geniş kapsamlıdır. DC'ye ek olarak, son zamanlarda yapılan çalışmalar; bir izoform olan RUNX 1c'nin spesifik ablasyonu yapılan farelerde, granulosit progenitörden bazofil progenitöre olan geçiş sırasındaki blok nedeniyle granulositik bazofillerde dramatik bir azalma göstermiştir. Ayrıca RUNX 1c yetmezliği özel olarak bazofil fonksiyonlarını zayıflatarak (mast hücrelerini değil ama), IL-3 veya nematodalara yanıt olarak artan IgE ilişkili kronik alerjik cilt reaksiyonları göstermektedir (145).

Monositlerde ve makrofajlarda RUNX 1, PU.1 ile koopere olup; makrofajların çoğalması ve farklılaşması için hayati önemi olan makrofaj koloni stimulating faktör reseptörü (M-CSF/CSF-1) regüle etmektedir (146,147). RUNX 1

ve RUNX 3 ayrıca, makrofaj ve monositik hücre dizilerinde; integrin benzeri Lenfosit fonksiyonu ilişkili antijen 1 (LFA-1)/CD11a, CD11c, Cd49d ve hücreler arası adhezyon molekülü 3 (ICAM-3) arasındaki adheziv etkileşimin en önemli kontrolörüdürler (148,150). LFA-1 ve ICAM-3 arasındaki etkileşim, Th1 hücrelerin polarizasyonlarına da katkıda bulunmaktadır ki bu durum; RUNX'in T hücre farklılaşması ve fonksiyonuna olan çok yönlü katkısını göstermektedir (149).

Mikroglia benzersiz fagositik hücre olup, Santral Sinir Sistemi (SSS) parankimi içinde yer almakta ve SSS'ni yaralanma ve mikroplara karşı korumaktadır. Langerhans hücrelerine benzer şekilde, mikroglia da; embriyonik ve perinatal gelişme döneminde RUNX 1 aracılığıyla yol sac denen primitif myeloid progenitör hücrelerden köken alıp SSS'ne yerleşmektedir (151,152). Doğumdan sonra RUNX 1, olgunlaşmamış mikrogliaların proliferasyonunu inhibe edip olgunlaşmayı desteklemektedir (152). İlginç olarak sinir sistemindeki yaralanma sonrası RUNX 1 ekspresyonunun reaktif olması; SSS sürveyans ve tamirinde olgun mikrogliaların rolü olduğunu düşündürmektedir (152).

2.3.8- Otoimmünite ve İnflamasyonda RUNX'in Rolü

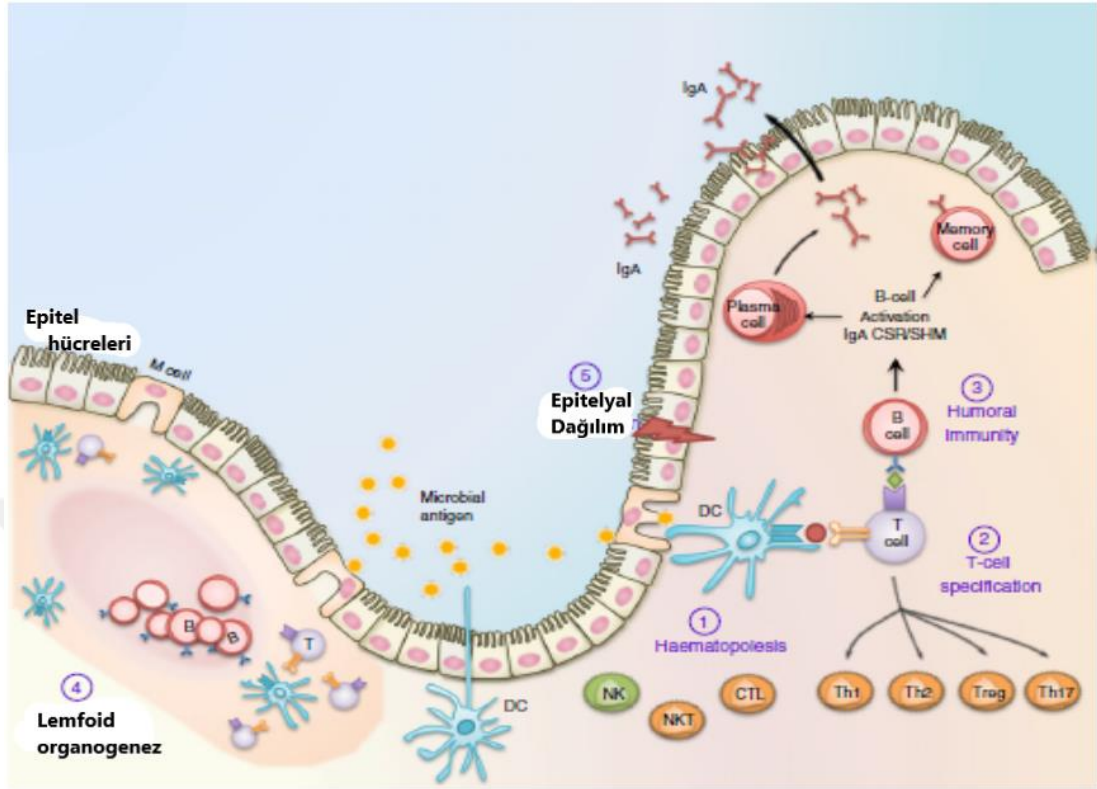
Timustan Treg hücreleri tarafından self-toleransın uyarılması, İmmün homeostazisin sağlanması için gereklidir ve bunun kaybı otoimmüniteyi başlatır (153). RUNX proteinlerinin nTreg ve iTreg (94,98) ile Th17 hücrelerinin (105,106) farklılaşmalarına ve fonksiyonlarına olan önemli katkıları; RUNX fonksiyonlarının otoimmünite ve inflamatuvar hastalıklara katkısı olduğunu göstermektedir. Bu olasılık, insana ait birçok otoimmün hastalıklarda genetik ilişkiyi araştıran, önemli ve geniş çalışmalarla desteklenmektedir:

Birincisi, PDCD1 lokusundaki bir intronda yer alan tek nükleotid polimorfizmi sonucu RUNX bağlanması değiştiği için; bazı etnik olarak farklı topluluklarda; sistemik lupus eritematozus (SLE) ile ilişkili bulunmuştur. Bu RUNX bağlanmasının değişmesi, RUNX 1'in kopması in vitro olarak gösterilmiş olup sonucunda, anormal PDCD1 ekspresyonu ile self toleransta baskılanma ve SLE'de hiperaktivite meydana gelmektedir (154). PDCD1 ayrıca, tümör İmmünitesinde negatif bir regülatör olup kanser İmmünoterapisinde de önemli bir hedefdir (155). Benzer şekilde; PDZ-domain phosphoprotein SLC9A3R1 ile N-Acetyl transperase

NAT9 arasındaki RUNX site varyasyonu nedeniyle kronik inflamatuvar deri hastalığı olan Psöriasis arasında bağlantı mevcuttur (156). Ek olarak RUNX 1 lokusu ile RUNX site ablasyonu arasında olan SLC22A4 transport genindeki tek nükleotid polimorfizmi de Romatoid Artrit arasında önemli bir ilişki mevcuttur (157). Tüm bu açıklamalardan sonra, RUNX bağlantı siteleriyle ilgili hastalıklarda; aynı bağlantı noktalarını tanıyan tüm RUNX proteinlerinin etkilerinin ortak ve aynı olduğu bilinmelidir (154,156,157). Bununla tutarlı olarak, RUNX 3 eksikliği olan farelerde; hiperplastik mukoza, lökosit infiltrasyonu ve Th1/Th2 karışımı otoimmün yanıtla karakterize spontan inflamatuvar barsak hastalığı gelişmektedir (99). İnsanlarda RUNX 3'ün bulunduğu 1p36 kromozomal bölge, inflamatuvar barsak hastalığı için hassas bölgedir (158,159). Daha önce yapılmış birçok GWAS araştırmalarında; inflamatuvar barsak hastalığının iki tipi olan ÇH ve Ülseratif Kolit (ÜK) ile ilişkili RUNX 3 lokus varyantı tespit edilmiştir (2,160). Son olarak RUNX 1 lokus ve düzeyleriyle ilgili tek nükleotid pleomorfizmi bulunan bir hastalık da pediyatrik astmadır (161). Bütün bu açıklamalar ışığında, RUNX fonksiyonlarındaki değişiklik; self toleransta disregülasyon, kronik lenfosit hiperaktivitesi ve organ otoimmünitesine neden olmaktadır.

2.3.9- Mukozal İmmünyetede RUNX'in Rolü

Her ne kadar daha yeni incelenmeye başlandıysa da RUNX proteinleri; mukozal sistemde, hem doğuştan hem edinilmiş İmmünitenin güçlü katılımcılarıdır. RUNX ailesinin tüm üyeleri, mukozal sistemdeki tüm majör İmmün soy dizilerinin etkileri, gelişimi ve olgunlaşmasında önemli roller oynamaktadır (Şekil. 9). RUNX fonksiyonel olarak İmmün cevabın tüm aşamalarında vardır. Örneğin biyogenezinde, organizasyonunda ve Peyer plakları gibi mukozal lenfoid dokuların fonksiyonlarında rol almaktadır (120). Bunların formasyonuna ek olarak, RUNX proteinler ayrıca; bu dokuların dışında periferik kanda antijen sunumu için DC olgunlaşmasını düzenleyerek T ve B hücrelerinin aktivasyonunda da görev alır (74,100,129).



Şekil 10. Mukozal İmmünitede RUNX (173)

Aktivasyonu takiben, efektör yardımcı T ve sitotoksik soy dizisinde; RUNX proteinleri, soy tanımlayan transkripsiyon faktörleriyle birlikte naif T hücrelerinin terminal başkalaşımını gerçekleştirmektedir (76,162). Patojenik etkenler ve çevresel faktörlere yanıt olarak ortaya çıkan IEL farklılaşması; mukozal sistemdeki RUNX 1-3'ün önemli katkısıyla olmaktadır (114,116). RUNX 1 ilk olarak, sitokin üretimi aracılığıyla mikrobik İmmüniteyi organize eden iNKT lenfositlerinin gelişiminde tespit edilmişlerdir (119,120). RUNX 3 ve RUNX 2 eş zamanlı olarak, mikroplara karşı mukozal İmmünitenin konfigürasyonunda temel yapı olan olgun B hücrelerinin tetiklenmesinde esaslı oluşturan IgA'nın olmazsa olmazıdır (163). Son olarak RUNX 1, gastrointestinal nişlerde bulunan FCRL4⁺ hafıza B hücrelerinin olgunlaşmasında görev alır (133).

Ayrıca RUNX proteinleri, doğuştan lökosit ve lenfositlerin fonksiyonları aracılığıyla da mukozal İmmüniteye katkıda bulunur. RUNX 3, antijen sunumundan bağımsız olarak çok önemli sitotoksik fonksiyon gösteren NK hücrelerinin, olgunlaşması ve çoğalması için gereklidir (142). Aynı şekilde, bazofil ekspansiyonu ve maksimum antiparazitik ve proinflamatuvar etki için de RUNX 1'e ihtiyaç vardır

(145). Makrofaj ve monositlerde RUNX, enfeksiyon bölgesine göçü organize eden adezyon komplekslerini düzenlemektedir (149,150). Hematopoetik hücelere ek olarak; mukozal mikroplara bariyer oluşturan, epitelyal hüceler de mukozal İmmüitenin önemli bir komponentidir. RUNX 3'ün, gastrik epitelyal hücelerde, IL-23A'yı transkripsiyonel olarak düzenlediği bildirilmiştir (164). IL-23A, Th17 aktivitesini yürüten proinflamatuvar sitokin IL-23'ün alt birimidir (165). RUNX 3, proinflamatuvar sitokin TNF- α ve IL-1 ile gastrik patojen *Helicobacter pylori* varlığında, IL-23A'nın sekresyonunun güçlü bir uyarıcısıdır (164). Bu durum bize RUNX proteinlerinin, epitelyal sitokin üretimi aracılığıyla doğuştan İmmüiteye önemli katkıları olduğunu göstermektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, ÇH ile ilişkili olan RUNX 3 ve THEMIS genlerinin ifade düzeyleri araştırıldı.

Çalışmamızda İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Gastroenteroloji Polikliniğine Kasım 2020-Kasım 2021 tarihleri arasında başvuran ve hem serolojik hem de histopatolojik olarak Çölyak Hastası kesin tanısı konmuş olan, 17 yaş altı 12 hasta incelendi. Gene aynı dönemde İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipi Laboratuvarına, Kemik İliği nakli için donör olarak başvurmuş 17 yaş altı sağlıklı donörlerde (6 kişi) veya Çölyak Hastalığı düşünülüp de “transglutaminaz” bakılarak Çölyak Hastası olmadıkları serolojik olarak kanıtlandıktan sonra 1 kişi, “Kontrol grubu”na dahil edildi.

ÇH düşünülen hastalarda seroloji testi de pozitif saptandıktan sonra, kesin tanı için endoskopi gereklidir. Hastaların duodenum, bulbus kısımlarından biyopsi örnekleri alınmaktadır. Alınan materyal mümkünse 3 ayrı yerden ve yaklaşık 2-3 mm’lik olmalıdır. Bu biyopsi materyelleri, patoloji laboratuvarında histopatolojik inceleme için gereklidir. Tez çalışması kapsamında gen ekspresyon ölçümleri için, işlem sırasında alınan bu biyopsi materyellerinden 1-2 mm’lik bir örnek alınıp hemen çalışıldı. Çalışma için ayrıca, fazladan endoskopik biyopsi alınmamıştır.

ÇH yakınmalarıyla başvuran hastalardan, öncelikle serolojik testleri yapılarak sonuçlarının ÇH ile uyumlu olması halinde barsak biyopsisi alınmış ve böylece kesin tanı konulması yoluna gidilmiştir. Sadece bir hastada, pandemi nedeniyle sokağa çıkma yasaklarının olduğu dönemde ve il dışından gelmesi nedeniyle; hasta ailesinin biyopsi için tekrar gelemeyeceklerini belirtmeleri üzerine, durum açıklanarak ve ailesinin onamı alınarak, hem serolojik testleriyle beraber biyopsisi de aynı anda yapılmıştır. Bu hastanın serolojisi ve biyopsisi negatif gelmiş olup kontrol grubuna dahil edilmiştir.

ÇH tanısı için Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi’ne başvuran ve ÇH olduğu düşünülen hastalardan serolojik testler, biyokimya ve doku tipi analizleri için kan örneği alınmaktadır. Çalışmamız için gerekli olan kan örneği, doku tipleme

analizi için alınan kan örneğinden yapıldı. Kontrol grubu için polikliniğe ÇH dışı nedenlerle başvuran, ÇH taraması gerekli olan (ancak ÇH saptanmayan) sağlıklı kontrolleri alındı. Bu hastalardan tetkik yapılma sürecinde istenmiş olan kan örneklerinden çalışma yapılarak, kontrollerden çalışma için ayrıca kan örneği alınmamıştır.

Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında Periferik kandan ve ayrıca hastalardan alınan doku biyopsilerinden de total RNA izolasyonları gerçekleştirildi

3.1-Total RNA İzolasyonu

İlk basamak olarak hastaların kan örneklerinden “Total RNA mini kit” ile total RNA izolasyonu yapıldı. Yöntem, üretici firmanın talimatlarına göre kit içerisinde hazır bulunan tampon solüsyonlar kullanılarak gerçekleştirildi.

RNA izolasyon kiti olarak GENEALL markası Hybrid-R RNA Isolation Kit (305-101 katalog) ve RiboEX kullanıldı.

1. 300 mikrolitre periferik kan örneğine 1 ml RBC lizis tampon solüsyonu eklenerek karıştırıldı,
2. 10 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 3000X g’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.
3. Pellet üzerine 400 mikrolitre RBC tampon solüsyonu ve 4 mikrolitre beta-merkaptotanol eklenerek hücreler süspanse hale getirildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. 400 mikrolitre %70’lik etanol eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra karışımın 500 mikrolitresi kolona aktarıldı.
5. 14-16.000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
6. Aynı kolona geriye kalan karışım eklendi ve tekrar 14-16.000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kolon yeni bir 2 ml toplama tüpüne alındı.
7. 400 mikrolitre yıkama solüsyonu eklenerek, 14-16.000x g’de 30 saniye santrifüj edildi.
8. Kolona 50 mikrolitre DNaz I solüsyonundan eklenerek, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. 400 mikrolitre W1 yıkama solüsyonundan eklendi ve 14-16.000x g'de 30 saniye santrifürlenerek süpernatant atıldı.
10. 600 mikrolitre yıkama solüsyonu eklendi ve 14-16.000x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Tekrar kolon toplama tüpüne alınarak 14-16.000x g'de 3 dakika santrifüjlendi.
11. Kolon yeni 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 50 mikrolitre RNaz içermeyen su eklenerek ve en az 1 dakika kolonun suyu emmesi için beklendi.
12. 14-16.000x g'de 1 dakika santrifüj edilerek 50 mikrolitre RNA elde edilmiş oldu. Bu RNA örneği nanodrop ile ölçülerek konsantrasyonu ile saflığı belirlendi.

Biyopsi materyalinden RNA elde etmek için GeneAll Ribospin TM II kiti kullanılmış ve firmanın talimatları doğrultusunda hareket edilmiştir. 30 mg doku örneği alınıp kriyo tüp sıvı azot içine atıldıktan sonra laboratuvarında boş alüminyum folyo içine alınıp havanın içinde tokmak ile ezildi. İyice parçalandıktan sonra 1,5 ml ependorf tüpüne alındı.

1. Doku örneği önceden soğutulmuş bir havanda sıvı azot ile ince bir toz haline getirildi. 20 mg kadar toz doku 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne kondu. 350 µl tampon RAL (% 1 β-merkaptolanol dahil) eklenip 30 saniye boyunca bastırılmalı (otomatik değil) vortekslendi.
2. 350 µl tampon RAL (% 1 β-merkaptolanol dahil) içinde 20-30 mg doku örneği homojen hale getirildi (çalışmamız için lörnek başına 346.5 µl RAL 3.5µl β-merkaptolanol).
3. Boncuk çırpıcı kullanarak doku örneğini 2,0 ml toplama tüpünde homojenize edildi. 350 µl tampon RAL (% 1 β-merkaptolanol dahil) ekleyip 30 saniye boyunca vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 2 dakika boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüjlenip süpernatantı yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu adım, tam olarak homojenleştirilmemiş döküntülerin neden olduğu bir mini spin kolonunun tıkanmasını önlemek amacıyla yapılır.
5. Süpernatanta bir hacim (süpernatantın hacmi kadar) %70 etanol eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.
6. Karışım bir mini spin kolonuna (tip F) aktarıldı.

7. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Alta geçen kısım atılır ve mini spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Karışım hacmi 750 μ l'i aşarsa, numunenin geri kalanıyla 4 ve 5 adımı tekrarlandı. Santrifüjlemeden sonra kolonda hiç lizat kalmaması gerekmektedir. Lizat kalmışsa, solüsyonun tamamı geçene kadar daha yüksek hızda tekrar santrifüjlenir.
8. 350 μ l tampon RW eklenir ve 30 saniye boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlenir. Alta geçen kısım atılır ve mini spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Mini spin kolon membranının merkezine 70 μ l DNase I reaksiyon karışımı eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. DNase I reaksiyon karışımı yapmak için, izolasyon başına 70 μ l Buffer DRB'ye 2 μ l DNase I çözeltisi eklendi. Kullanana kadar DNase I aktivitesini korumak için buz üzerinde tutuldu.
10. 350 μ l tampon RW eklenir ve 30 saniye boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Alta geçen kısım atılır ve mini spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
11. 500 μ l tampon RSW eklenir ve 30 saniye boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Alta geçen kısım atılır ve mini spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Tekrar 500 μ l tampon RSW ekleyin ve 30 saniye boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlenir. Alta geçen kısım atılır ve mini spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
13. Kalan yıkama tamponunu çıkarmak için 1 dakika boyunca tam hızda ($> 13.000 \times g$) santrifüjlenir. Mini spin kolonu yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
14. Mini spin kolonundaki zarın merkezine 50 μ l Nükleaz içermeyen su eklendi. 1 dakika bekletildi.
15. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlenir. Saflaştırılmış RNA, uzun süreli saklama için $-70^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.2- cDNA Sentezi

İkinci basamak, bu RNA örneklerinden cDNA sentezinin yapılmasıdır. cDNA sentezi hazır ticari “WizScript cDNA Sentez Kiti” (W2211, Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir.

1.PCR tüpüne RNA örneğinden konarak üzerine primer ve su eklendi.

2.Daha sonra reaksiyon solüsyonu, RNaz inhibitörü, dNTP karışımı ve RT enzimi içeren hazır kit eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 42 °C’de 1 saat inkübe edildi.

3.70 °C’de 5 dakika tutularak işlem sonlandırıldı.

3.3- Real Time PCR

Üçüncü basamak olarak “Gen ekspresyon Assay kiti” kullanılarak Real-time PCR yöntemiyle gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Real-Time qPCR için kullanılan kitin markası Wizbio olup adı, WizPureq PCR Master (SYBR) ve Katalog No’su 1711’ dir.

Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri şöyledir:

2X MasterMix (SYBR-Green ile)	10 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
cDNA kalıp	2 µl
RNase-free distile su	5 µl
Toplam	18 µl

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Bu reaksiyon ROCHE Cobac Z 480 Real-Time PCR cihazında yapılmıştır.

Üretici firmanın talimatlarına göre cDNA örneği, Master mix ve assay solüsyonu ile su eklenerek 96 kuyucuklu plaklara örnekler dağıtıldı. Bu plaklar Real-time PCR cihazına yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Sonunda ilgili bilgisayar programı

kullanılarak analizi yapıldı. Real-time PCR basamağı üç kez tekrar edilerek ortalama değerleri alındı.

Kullanılan primer dizilimi:

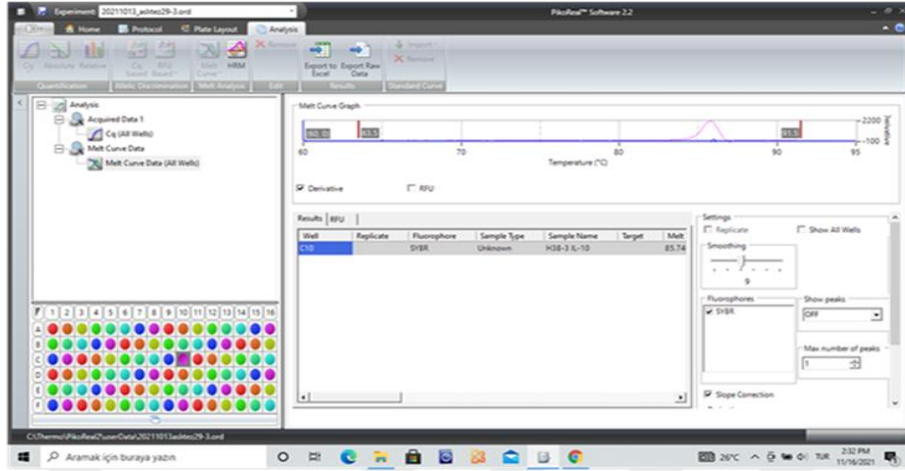
Gen adı	Baz Dizisi 5'-3'
ACTB-F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
ACTB-R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
THEMIS-F	TGAAGGTTGTGAGTCTCTACAGC
THEMIS-R	GGATGCCCTAGTCTACTTGGTC
RUNX 3-F	GGCAATGACGAGAACTACTCCG
RUNX 3-R	GATGGTCAGGGTGAAACTCTTCC

F: forward, R:reverse

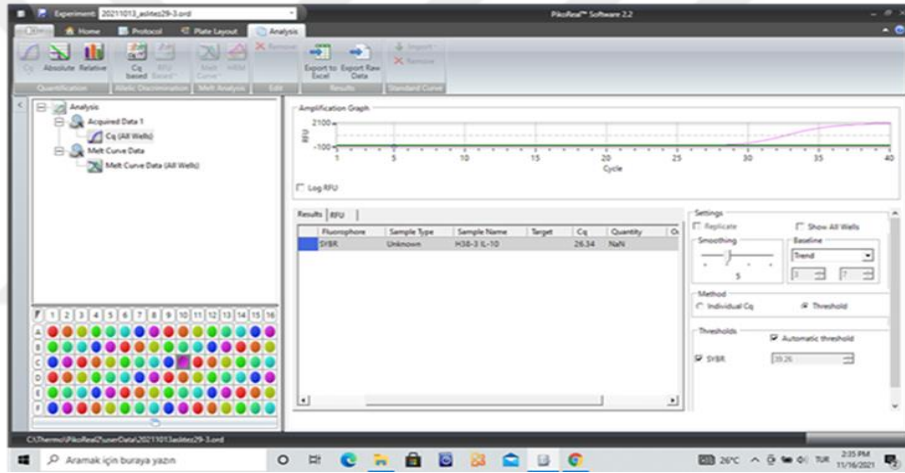
Hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda, her bir örneğin mRNA için Real-Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edilmiştir. Tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Hasta grubunda hedef mRNA Ct değerinden, referans RNA Ct değeri çıkarılarak hasta grubu Δ Ct değerleri elde edilmiştir. Kontrol grubunda da hedef mRNA Ct değerinden referans Ct değeri çıkarılarak kontrol grubu Δ Ct değerleri sağlanmıştır. Sonuçta hasta grubu Δ Ct değerinden kontrol grubu Δ Ct değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri elde edilmiştir. $\Delta\Delta$ Ct değerlerinde Fold Change hesaplaması yapılmış ve bu değer 1'in üzerinde çıkması halinde kontrol grubuna göre, hasta grubunda mRNA ekspresyonunda artış gösterdiği düşünülmüştür. Fold Change değerinin 1'in altında olması durumunda ise hasta grubunun kontrol grubuna göre mRNA ekspresyonunda azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Çölyak hastalığı için başvuran hastalara rutin olarak HLA-DQ doku tipi testi yapılmaktadır. Bu test için hastadan bir adet EDTA'lı tüpe kan alındı. Bu kan örneğinden DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra "Sekans Spesifik Oligonükleotit Prob" (SSOP) tekniği ile hazır ticari kit kullanılarak üreticinin talimatlarına göre doku tipi testi gerçekleştirildi. Sonuçları Luminex fluoroanalyzer cihazında analiz edildi.

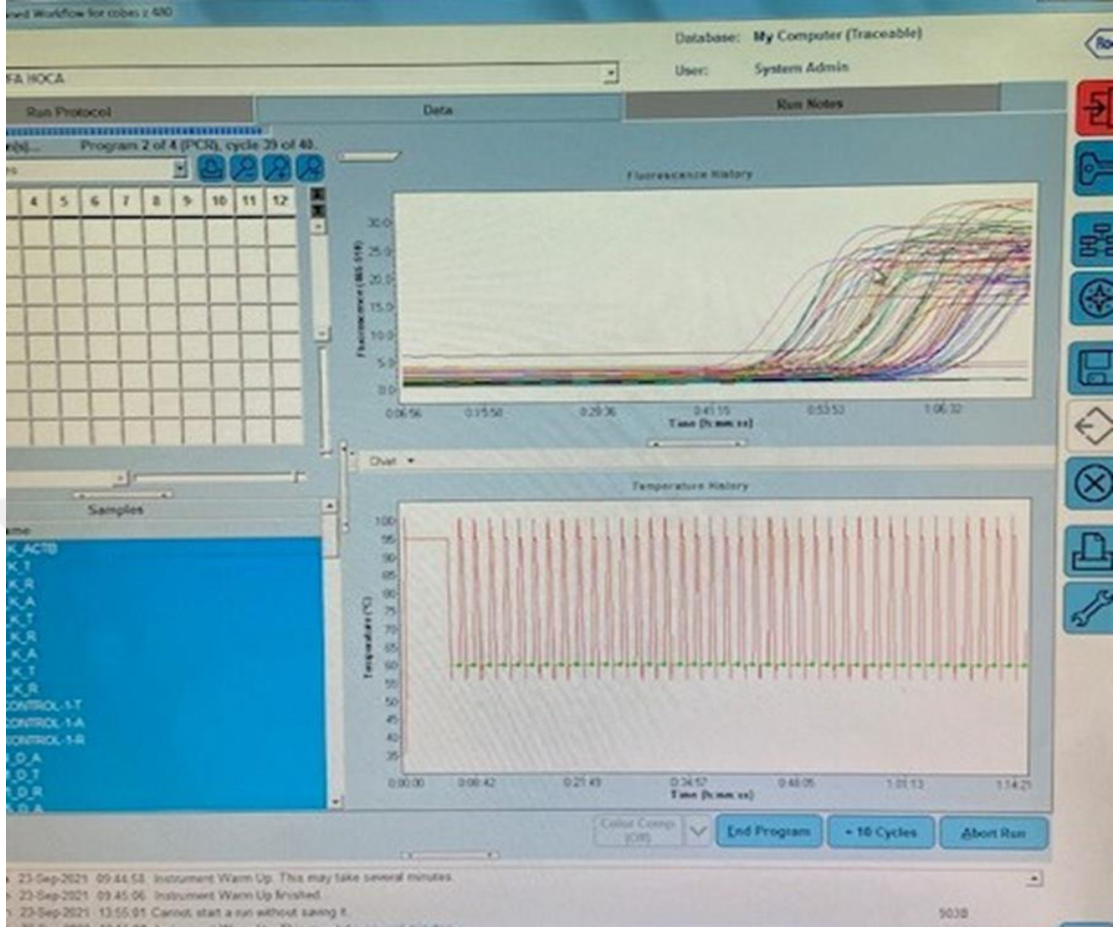
A)



B)



Şekil 11. A- Melting Analizi: Primerin bağlandığı sıcaklık. Tek pik var. Tek bölgeye bağlanması beklenir. B- Ct = Cq değeri (eşik değeri döngüsü) eşik çizgisini kestiği yer. Qiagen’de 40 döngü var. Bu yüzden 10-35 döngü arası anlamlı olarak seçildi.



Şekil 12. Bu çalışmada incelenen 12 Çölyak hastası kan ve doku örnekleriyle; 8 kontrol grubunun kan örneklerinin ekspresyon değerleri toplu olarak görülmektedir. Threshold çizgisini ilk geçen eğri, en çok ekspresyon gösteren cDNA'nın eğrisidir. Bu çalışmada $F_c = K_{at}$ değişimi $= 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve $F_r =$ Düzenlenmiş kat değişimi Qiagen'in hazır platformuna göre hesaplanmıştır. F_c değerinin <1 olması ekspresyonun azaldığını göstermektedir

4. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan ÇH'na ait demografik veriler Tablo 2'de verilmiştir

Tablo 2: Çalışmada kullanılan ÇH. hasta tablosu

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Marsh Sınıfı	HLA	tTG Antikoru	Anti EmA
1	9	K	+ 3b	DQA1*01 DQB1*03:02 DQ8	IgG 135.9 IgA 188.5	IgG 1/100 IgA>/100
2	5	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 91.7 IgA>200.0	IgG 1/100 IgA Negatif
3	6	K	+ 3c	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 48 IgA>200.0	IgG 1/50 IgA>/100
4	3	K	+ 3c	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG14.4 IgA>200.0	IgG 1/100 IgA>/100
5*	7	K	+ 3a	DQA1*01 DQB1*03:02 DQ8	IgG 7.3 IgA 47.9	IgG Negatif IgA>/100
6	17	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 4.1 IgA 84.9	IgG 1/100 IgA>/100
7	17	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 42.4 IgA 89.3	IgG 1/100 IgA>/100
8	9	K	+ 3c	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 76.8 IgA>200.0	IgG Negatif IgA>/100
9*	3	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG>200.0 IgA 187	IgG 1/50 IgA>/100
10	7	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 18.7 IgA 30	IgG 1/100 IgA 1/100
11	17	K	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 9.1 IgA 200	IgG 1/20 IgA>/100
12**	11	E	+ 3b	DQA1*05 DQB1*02 DQ2,5	IgG 2.1 IgA 9.7	IgG Negatif IgA 1/100

*Tip I diyabeti olan hasta, **Paratiroid hormonu olan hasta

Araştırmamızda tanı konan hastaların biri erkek on biri de kadın olup cinsiyet oranlarımız; %8.3 erkek ve %91.7 kadındır. Yaş ortalaması 9.25 (\pm 7.5)'tur.

Hastalarımızın ikisinde sadece Tip I Diabetes Mellitus tespit edilmiştir ki bu oran %16,6'dır (Tablo.2'deki *5 ve *9'cu hasta). Bir hastada Paratiroid adenomu tespit edilmiş olup Parathormon düzeyi 1761,8 ng/L (referans değeri 18,5-88,0 ng/L) bulunmuştur. Paratiroid adenomu her ne kadar çocuklarda sık görülen bir durum değilse de ÇH'da sıklığı da düşüktür (Tablo.2'deki **12. Hasta). Bu konuda literatür taramasında herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Hastaların tümünde Demir Eksikliği Anemisi tespit edildi.

Çölyak ön tanısı almış çocuklardan birisinin GIS biyopsisi yapılarak çalışma grubuna eklenmesi planlanırken, patoloji sonucu ÇH ile ilişkisi olmadığı ve tamamen normal olduğu tespit edilince kontrol grubuna dahil edilerek takibe alınmış ve diğer serolojik testleri de normal bulunmuştur. Bu hastanın hem periferik kan ve hem de özellikle dokudaki ekspresyon sonuçları; hasta ekspresyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 3: Hastaların demografik ve klinik verileri

Ortalama Hasta Yaşı		9,25 ± 7,5
		n Değeri (Yüzdesi)
Cinsiyet	Kadın	11 (%91,6)
	Erkek	1 (% 8,4)
HLA Yüzdesi	DQ2,5	10 (%83,33)
	DQ8	2 (% 16,67)
Anti tTG Yüzdeleri	IgA>200	5 (%41,17)
	IgA>50	4 (%33,33)
	IgA<50	3 (%25)
	IgG>200	1 (%8)
	IgG>50	3 (%25)
	IgG<50	8 (%67)
Anti EmA Yüzdeleri	IgA>1/100	11 (%91,67)
	Negatif	1 (%8,33)
	IgG>1/100	6 (%50)
	IgG>50	3 (%25)
	Negatif	3 (%25)
MARSH sınıfı ve dağılım oranları	3a	1 (% 8)
	3b	8 (% 67)
	3c	3 (% 25)

Sekiz kontrol hastasında ise iki erkek olup, altısı kadındır ve oranlar %25 erkek bireye karşılık %75 kadındır. Kontrol grubunun, hasta grubu ile benzer demografik özelliklerde olacak şekilde seçilmesine gayret gösterilmiştir. Yaş ortalaması 4.33 (±2.67)'dir. Anti tTG değerleri negatif olup tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada kullanılan kontrol grubu tablosu

Kontrol No	Yaş	Cinsiyet	Biyopsi	Anti-tTG
1	5	E	-	Yok
2	2	E	+	IgG 1,5 IgA 0,1
3	7	K	-	IgG<0,1 IgA 1,8
4	5	K	-	IgG 1,6 IgA 8,3
5	2	K	-	IgG 0,1 IgA 1,9
6	5	K	-	IgG 0,1 IgA 3,0
7	17	K	-	IgG 0,3 IgA 1,6
8	9	K	-	Yok

Tablo 5: 96 kuyucuklu plakta dizilim

	ACT	THEM	RUNX	ACT	THEM	ACT	THEM	RUNX	ACT	THEM			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.Hasta kan	Kan	Kan	5.Hasta kan	Kan	Kan	9.Hasta kan	Kan	Kan				1.Kontrol kan örneği
B	1.Hasta doku	Doku	Doku	5.Hasta doku	Doku	Doku	9.Hasta doku	Doku	Doku				2.Kontrol kan örneği
C	2.Hasta kan	Kan	Kan	6.Hasta kan	Kan	Kan	10.Hasta kan	Kan	Kan				3.Kontrol kan örneği
D	2.Hasta doku	Doku	Doku	6.Hasta doku	Doku	Doku	10.Hasta doku	Doku	Doku				4.Kontrol kan örneği
E	3.Hasta kan	Kan	Kan	7.Hasta kan	Kan	Kan	11.Hasta kan	Kan	Kan				5.Kontrol kan örneği
F	3.Hasta doku	Doku	Doku	7.Hasta doku	Doku	Doku	11.Hasta doku	Doku	Doku				6.Kontrol kan örneği
G	4.Hasta kan	Kan	Kan	8.Hasta kan	Kan	Kan	12.Hasta kan	Kan	Kan				7.Kontrol kan örneği
H	4.Hasta doku	Doku	Doku	8.Hasta doku	Doku	Doku	12.Hasta doku	Doku	Doku				8.Kontrol kan örneği

Tablo 6: Hasta verilerinin analiz tablosu

	Kan β -Aktin				Kan THEMIS				Kan RUNX 3			
H1	1T	2T	3T	Ort	1T	2T	3T	Ort	1T	2T	3T	Ort
Ct	14,53	12,94	16,12	14,53	28,9	23,52	26,79	26,40	21,33	19,92	22,75	21,33
Δ Ct									9,44			
$\Delta\Delta$ Ct									4,96			
$2^{-\Delta\Delta$ Ct}									0,03			

H1: Hasta 1, 1T: 1. tekrar, 2T: 2. tekrar, 3T: 3. Tekrar, Ort: ortalama, Ct: Eşik değer döngüsü

Tablo 7: Kontrol grubu verilerinin analiz tablosu

K1	Kan β -Aktin				Kan THEMIS				Kan RUNX 3				
	1T	2T	3T	Ort	1T	2T	3T	Ort	1T	2T	3T	Ort	
Ct	14,60	12,99	16,21	14,60	20,14	20,44	23,60	21,39	21,81	20,42	23,19	21,81	
Δ Ct									6,79				

K1: Kontrol 1, 1T: 1. tekrar, 2T: 2. tekrar, 3T: 3. Tekrar, Ort: ortalama, Ct: Eşik değer döngüsü

Tablo 8: Hastalara ait THEMIS ekspresyon değerleri.

	Doku			Kan		
	Fc	Fr	p	Fc	Fr	p
H1-THEMIS	1,47	1,47	0,37	0,29	-3,43	0,99
H2-THEMIS	0,58	-1,73	0,37	0,45	-2,21	0,99
H3-THEMIS	3,58	3,58	0,37	0,25	-4,01	0,37
H4-THEMIS	1,16	1,16	0,37	0,54	-1,87	0,99
H5-THEMIS	2,74	2,74	0,37	0,73	-1,37	0,99
H6-THEMIS	213,78	213,78	0,37	1,93	1,93	0,37
H7-THEMIS	0,18	-5,57	0,37	1,89	1,89	0,37
H8-THEMIS	1,36	1,36	0,37	4,3	4,3	0,37
H9-THEMIS	0,05	-18,29	0,78	8,38	8,38	0,37
H10-THEMIS	0,51	-1,95	0,38	7,28	7,28	0,37
H11-THEMIS	1,16	1,16	0,37	29,18	29,18	0,37
H12-THEMIS	0,13	-7,75	0,78	0,31	-3,23	0,99

Kırmızı olarak yazılı değerler ekspresyonunda artış olan hastaların kat değişimi değerleridir.

Tablo 9: Hastalara ait RUNX 3 ekspresyon değerleri.

	Doku			Kan		
	Fc	Fr	p	Fc	Fr	p
H1-RUNX 3	1,06	1,06	0,37	0,07	-13,86	0,37
H2-RUNX 3	0,03	-33,28	0,23	1,68	1,68	0,83
H3-RUNX 3	0,41	-2,43	0,38	0,39	-2,58	0,83
H4-RUNX 3	0,45	-2,24	0,37	0,06	-16,64	0,37
H5-RUNX 3	1,69	1,69	0,37	0,96	-1,04	0,43
H6-RUNX 3	0,28	-3,55	0,37	0,45	-2,2	0,47
H7-RUNX 3	0,13	-7,41	0,37	0,21	-4,7	0,42
H8-RUNX 3	0,72	-1,39	0,37	2,48	2,48	0,41
H9-RUNX 3	0,27	-3,76	0,37	1,77	1,77	0,62
H10-RUNX 3	0,4	-2,51	0,37	1,1	1,1	0,39
H11-RUNX 3	0,26	-3,89	0,39	0,82	-1,22	0,46
H12-RUNX 3	0,25	-3,93	0,37	0,15	-6,54	0,37

Sarı ile boyananlar artışı gösteren hastaların kat değişimi değerleridir.

Tablo 10: Çölyak Tanılı Hasta Demografik ve Klinik Bilgileri

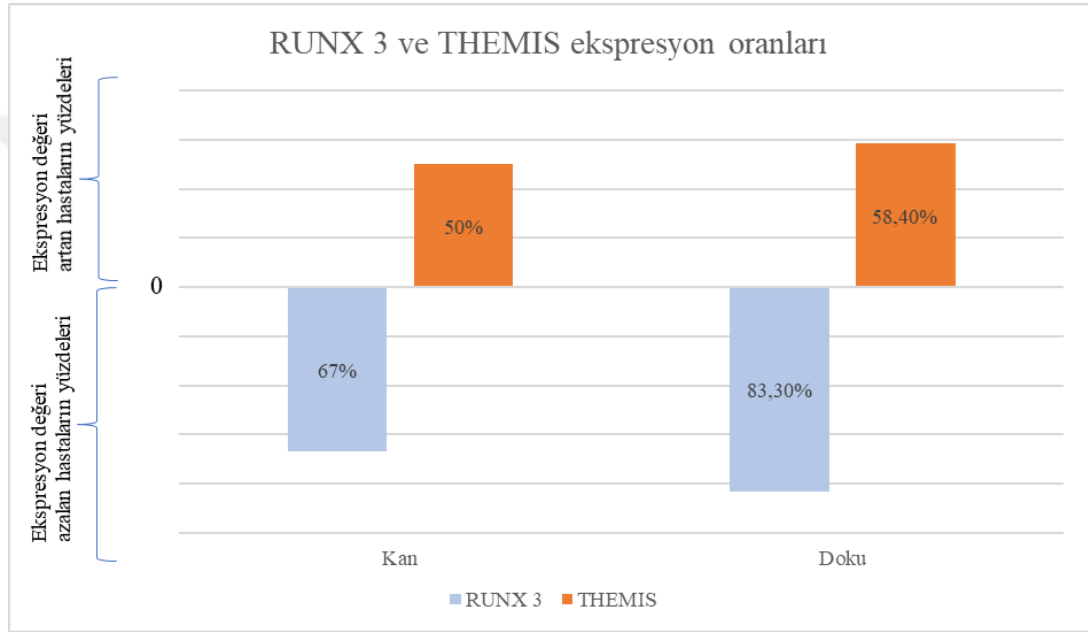
Hasta	Yaş	Cinsiyet	Marsh Sınıfı	HLA	TA	Anti-E	THEMIS		RUNX 3	
							KanFr	DokuFr	KanFr	DokuFr
1	9	K	+ 3b	DQ8	IgG 135.9 IgA 188.5	IgG 1/100 IgA>/100	-3,43	1,47	-13,86	1,06
2	5	K	+ 3b	DQ2,5	IgG 91.7 IgA>200.0	IgG 1/100 IgA Negatif	-2,21	-1,73	1,68	- 33,28
3	6	K	+ 3c	DQ2,5	IgG 48 IgA>200	IgG 1/50 IgA>/100	-4,01	3,58	-2,58	-2,43
4	3	K	+ 3c	DQ2,5	IgG14.4 IgA>200	IgG 1/100 IgA>/100	-1,87	1,16	-16,64	-2,24
5*	7	K	+ 3a	DQ8	IgG 7.3 IgA 47.9	IgG Negatif IgA>/100	-1,37	2,74	-1,04	1,69
6	17	K	+ 3b	DQ2,5	IgG 4.1 IgA 84.9	IgG 1/100 IgA>/100	1,93	213,78	-2,2	-3,55
7	17	K	+ 3b	DQ2,5	IgG 42.4 IgA 89.3	IgG 1/100 IgA>/100	1,89	-5,57	-4,7	-7,41
8	9	K	+ 3c	DQ2,5	IgG 76.8 IgA>200	IgG Negatif IgA>/100	4,3	1,36	2,48	-1,39
9*	3	K	+ 3b	DQ2,5	IgG>200 IgA 187	IgG 1/50 IgA>/100	8,38	-18,29	1,77	-3,76
10	7	K	+ 3b	DQ2,5	IGG 18.7 IGA 30	IgG 1/100 IgA 1/100	7,28	-1,95	1,1	-2,51
11	17	K	+ 3b	DQ2,5	IGG 9.1 IGA 200	IgG 1/20 IgA>/100	29,18	1,16	-1,22	-3,89
12**	11	E	+ 3b	DQ2,5	IGG 2.1 IGA 9.7	IgG Negatif IgA 1/100	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93

*Dibetes Mellitus Tip I saptanan hastalar, **Paratiroid Adenomunu tespit edilen hasta, TA: Transglutaminaz antikorunu, Anti-E: Anti-Endomisyum antikorunu, K: Kadın, E: Erkek, Fc: kat değişimi, Fr: düzenlenmiş kat değişimi

Tablo 11: Hastaların THEMIS ve RUNX 3 ekspresyon tablosu

	Ekspresyonu Azalan Hasta Sayısı	Ekspresyonu Artan Hasta Sayısı
Kan RUNX 3	8	4
Doku RUNX 3	10	2
Kan THEMIS	6	6
Doku THEMIS	5	7

Tablo 12: Hastaların THEMIS ve RUNX 3 ekspresyon değişimlerinin yüzde grafiği



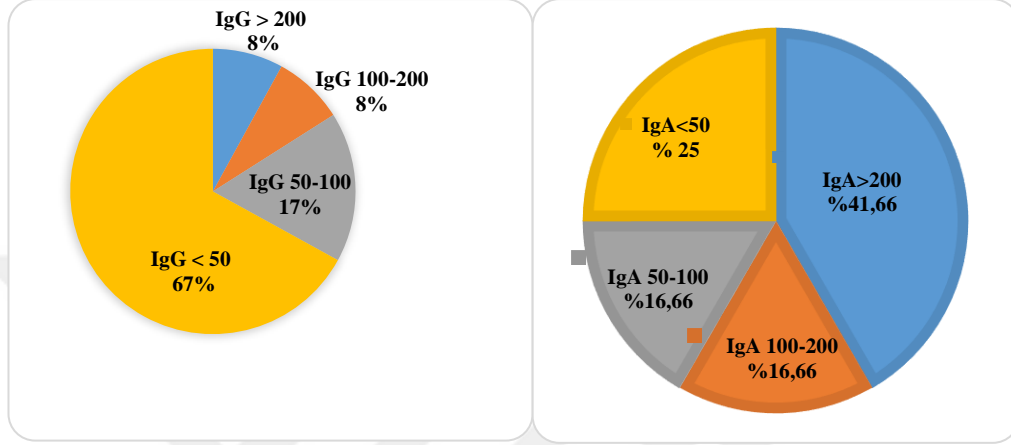
Tablo 11 ve 12’de görüldüğü üzere; RUNX 3 ekspresyonu doku örnekleri dikkate alındığında hastaların %83,3’ünde azalmışken, kan örnekleri dikkate alındığında hastaların %67’sinde azalmıştır. Ancak THEMIS ekspresyonu kan örnekleri dikkate alındığında hastaların %50’sinde artarken, dokuda hastaların %58,4’ünde artmıştır.

Tablo 10 ve 11’e bakıldığında, iki istisna dışında hastalıkta doku RUNX 3’ün azaldığı görülmektedir. Öte yandan yine Tablo 12’ye tek tek bakıldığında, Tablo 10 ve 11’de yaygın istisnalar var gibi görünse de; ortalama olarak hastalıkta gerek kan gerek dokuda, RUNX 3’te düşme ve THEMIS’te artma eğilimi olduğu söylenebilmektedir.

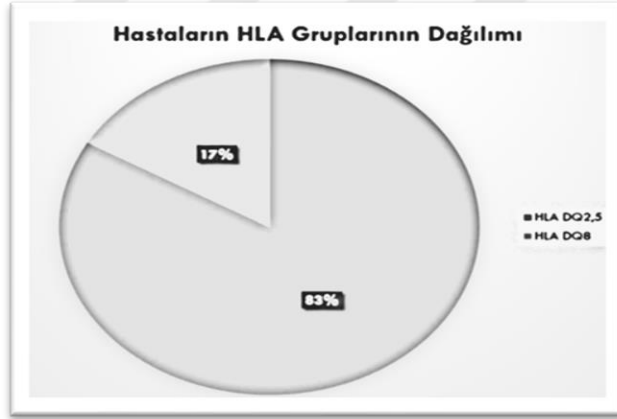
Tablo 10’da görüldüğü gibi THEMIS genelde artış yönünde eğilimli olup, hastalarda ya kan ya dokuda artmıştır. Buna uymayan, yani hem kan hem dokuda

THEMIS değerleri azalan sadece iki vaka mevcuttur. 2 numaralı hastada bu azalma hafif düzeyde, sınırdadır. Ancak paratiroid adenomu olan 12 nolu hastada THEMIS değerleri hem kan hem de dokuda belirgin olarak azalmıştır.

Tablo 13: Hastaların transglutaminaz antikor IgA ve IgG değerlerinin karşılaştırılması

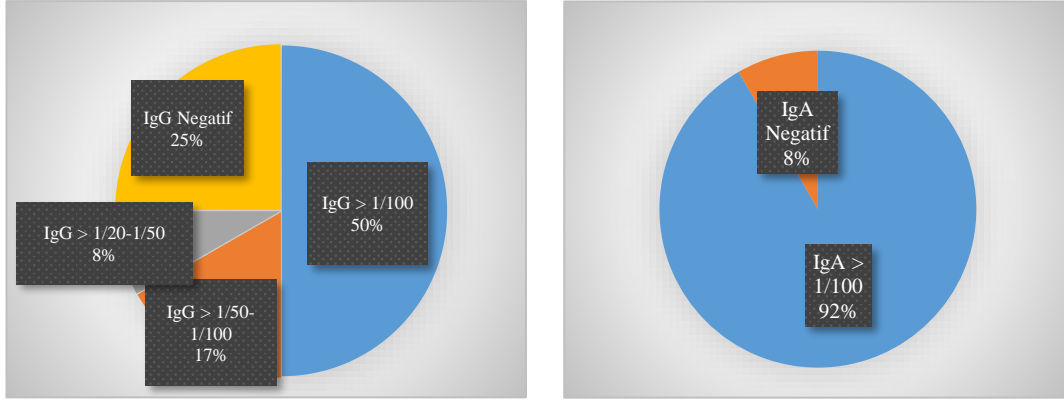


Tablo 14: Hastalarda HLA doku grubu dağılımı grafiği



Toplam 12 hastamızdaki HLA doku tipi dağılımları, 10 tanesi (%83,3) DQ2,5 ve ikisi (%16,7) DQ8 olarak tespit edildi (1,2).

Tablo 15: Hastaların antiendomisyum antikor IgA ve IgG değerlerinin karşılaştırılması



Tablo 16: Marsh Sınıflamasına Göre Ekspresyon

Marsh Sınıflama	THEMIS		RUNX 3		YORUM
	Kan Fr	Doku Fr	Kan Fr	Doku Fr	
3a	-1,37	2,74	-1,04	1,69	1 hastada Kanda THEMIS ve RUNX 3 ekspresyonları azalırken, dokuda ekspresyonlar artış göstermiştir.
3b	-3,43	1,47	-13,86	1,06	Dokuda THEMIS ekspresyonu artan hasta oranı %37,5 Kanda THEMIS ekspresyonu artan hasta oranı %62,5 Dokuda RUNX 3 ekspresyonu azalan hasta oranı %100 (1,06 sınır değer kabul edilirse) Kanda RUNX 3 ekspresyonu azalan hasta oranı %62,5
	-2,21	-1,73	1,68	-33,28	
	1,93	213,78	-2,2	-3,55	
	1,89	-5,57	-4,7	-7,41	
	8,38	-18,29	1,77	-3,76	
	7,28	-1,95	1,1	-2,51	
	29,18	1,16	-1,22	-3,89	
	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93	
3c	-4,01	3,58	-2,58	-2,43	Dokuda THEMIS ekspresyonu %100 hastada artmıştır Kanda THEMIS ekspresyonu %33,33 hastada artmıştır. Dokuda RUNX 3 ekspresyonu %100 hastada azalmıştır Kanda RUNX 3 ekspresyonu %66,6 hastada azalmıştır
	-1,87	1,16	-16,64	-2,24	
	4,3	1,36	2,48	-1,39	

Tablo 17: tTG IgA Antikorlarına Göre Ekspresyon

tTG Antikorları IgA	THEMIS		RUNX 3		YORUM
	Kan Fr	Doku Fr	Kan Fr	Doku Fr	
IgA>200	- 2,21	-1,73	1,68	-33,28	Kan THEMIS %40 hastada artmış
	-4,01	3,58	-2,58	-2,43	Kan RUNX 3 %60 hastada azalmış
	-1,87	1,16	-16,64	-2,24	Doku THEMIS %80 hastada artmış
	4 ,3	1,36	2,48	-1,39	Doku RUNX 3 %100 hastada azalmış
IgA= 100-200	29,18	1,16	-1,22	-3,89	
	-3,43	1,47	-13,86	1,06	Hem kan hem dokuda RUNX 3 ekspresyonları %50 hastada azalmışken, THEMIS %50 hastada artmıştır
IgA= 50-100	8,38	-18,29	1,77	-3,76	
	1,93	213,78	-2,2	-3,55	THEMIS kanda hastaların %100'ünde ve dokuda hastaların %50'sinde artarken ; RUNX 3 her iki yerde hastaların %100'ünde azalmıştır
IgA<50	1,89	-5,57	-4,7	-7,41	
	-1,37	2,74	-1,04	1,69	Hem kan hem dokuda RUNX 3 ekspresyonları %67 hastada azalmışken, THEMIS %33 hastada artmıştır .
	7,28	-1,95	1,1	-2,51	
	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93	

IgA'nın akut dönem antikorlu olduğu düşünüldüğünde IgA>100 olan vaka oranı %58,33'tür. IgG'nin ise geç dönem antikorlu olduğu düşünüldüğünde IgG>100 olan vaka oranı %16,66'dır. Kontrol grubunda tüm bu antikorlar negatif bulunmuştur.

Tablo 18: tTG IgG antikorlarına göre ekspresyon

tTG Antikorları IgG	THEMIS		RUNX 3		YORUM
	Kan Fr	Doku Fr	Kan Fr	Doku Fr	
IgG>200	8,38	-18,29	1,77	-3,76	THEMIS hasta kanında artarken, RUNX 3 doku ekspresyonları azalmıştır
IgG=100-200	-3,43	1,47	-13,86	1,06	Sadece kan ekspresyonları azalmıştır
IgG=50-100	-2,21	-1,73	1,68	-33,28	THEMIS kan ve doku ekspresyonları %50 hastada artmıştır
	4,3	1,36	2,48	-1,39	RUNX 3 doku ekspresyonu %100 hastada azalırken; kanda %100 hastada artmıştır
IgG<50	-4,01	3,58	-2,58	-2,43	Kan THEMIS ekspresyonunda %50 hastada artma
	-1,87	1,16	-16,64	-2,24	Doku THEMIS ekspresyonunda %62,5 hastada artma
	-1,37	2,74	-1,04	1,69	Kan RUNX 3 ekspresyonunda %87,5 hastada azalma
	1,93	213,78	-2,2	-3,55	Doku RUNX 3 ekspresyonunda %87,5 hastada azalma
	1,89	-5,57	-4,7	-7,41	
	7,28	-1,95	1,1	-2,51	
	29,18	1,16	-1,22	-3,89	
-3,23	-7,75	-6,54	-3,93		

tTG: doku transglutaminaz, Fr: düzenlenmiş kat değişimi

Tablo 19: Anti-EmA IGA Antikorlarına Göre Ekspresyon

Anti-EmA IGA	THEMIS		RUNX 3		YORUM
	KanFr	DokuFr	KanFr	DokuFr	
IgA>1/100	-3,43	1,47	-13,86	1,06	
	-4,01	3,58	-2,58	-2,43	
	-1,87	1,16	-16,64	-2,24	Kan THEMIS ekspresyonunda % 54,54 hastada artış mevcut
	-1,37	2,74	-1,04	1,69	Kan RUNX 3 ekspresyonunda % 72,72 hastada azalma mevcut
	1,93	213,78	-2,2	-3,55	Doku THEMIS ekspresyonunda % 63,63 hastada artış mevcut
	1,89	-5,57	-4,7	-7,41	Doku RUNX 3 ekspresyonunda % 83,33 hastada azalma mevcut
	4,3	1,36	2,48	-1,39	
	8,38	-18,29	1,77	-3,76	
	7,28	-1,95	1,1	-2,51	
	29,18	1,16	-1,22	-3,89	
IgA Negatif	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93	
	-2,21	-1,73	1,68	-33,28	Kan RUNX 3 değeri hariç hepsinde azalma mevcut

EmA: Endomisyum antikor, Fr: düzenlenmiş kat değişimi

Anti EmA antikorlarına bakıldığında sadece bir hasta IgA negatif bulunmuştur. Yani hastalığın daha çok akut safhada olduğu düşünülmelidir. En çok azalma RUNX 3 ve dokuda görülmektedir. THEMIS ise akut safhada dokuda daha fazla olmak üzere artış göstermektedir.

Tablo 20: Anti EmA IgG antikorlarına göre ekspresyon

Anti EmA IgG	THEMIS		RUNX 3		YORUM
	Kan Fr	Doku Fr	Kan Fr	Doku Fr	
IgG>1/100	-3,43	1,47	-13,9	1,06	THEMIS ekspresyonundaki artış hem kan hem dokuda % 50 hastada bulunmuştur. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma kanda %66,66 hastada görülürken, dokuda %83,33 hastada olmuştur
	-2,21	-1,73	1,68	-33,28	
	-1,87	1,16	-16,6	-2,24	
	1,93	213,78	-2,2	-3,55	
	1,89	-5,57	-4,7	-7,41	
IgG<50	7,28	-1,95	1,1	-2,51	THEMIS ekspresyonundaki artış hem kan hem dokuda % 66,66 oranındaki hastada bulunmuştur. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma kanda %66,66 hastada görülürken, dokuda %100 hastada olmuştur
	-4,01	3,58	-2,58	-2,43	
	8,38	-18,29	1,77	-3,76	
	29,18	1,16	-1,22	-3,89	
IgG Negatif	-1,37	2,74	-1,04	1,69	THEMIS ekspresyonundaki artış kanda %33,33 hastada görülürken, dokuda %66,66 hastada artış olmuştur. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma hem kan hem dokuda %66,66 hastada olmuştur
	4,3	1,36	2,48	-1,39	
	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93	

EmA: endomisyum antikor, Fr: düzenlenmiş kat değişimi

Anti Endomisyum antikorlarına bakıldığında IgG>1/100 hasta %50 bulunmuştur. IgG düzeylerine göre üç ayrı bölümde THEMIS'in dağılımları birbirine yakın ve %50 civarında artış söz konusu iken RUNX 3 kanda üç kategoride de %66 azalmış fakat dokudaki azalması, özellikle ilk iki kategoride %83,33 ve %100 olmuştur.

Tablo 21: Yaşa göre genlerin ekspresyon oranları

Hasta No	Yaş	Marsh Sınıfı	HLA	Trans glutaminaz Antikoru	Anti Endomycium Antikoru	THEMIS		RUNX 3	
						Kan Fr	Doku Fr	Kan Fr	Doku Fr
4	3	3c	DQ2,5	IGG14.4	IgG 1/100	-1,87	1,16	-16,64	-2,24
9*	3	3b	DQ2,5	IGG>200.0	IgG 1/50	8,38	-18,29	1,77	-3,76
2	5	3b	DQ2,5	IGG 91,7	IgG 1/100	-2,21	-1,73	1,68	-33,28
3	6	3c	DQ2,5	IGG 48	IgG 1/50	-4,01	3,58	-2,58	-2,43
5*	7	3a	DQ8	IGG 7.3	IgG Negatif	-1,37	2,74	-1,04	1,69
10	7	3b	DQ2,5	IGG 18.7	IgG 1/100	7,28	-1,95	1,1	-2,51
1	9	3b	DQ8	IGG 135.9	IgG 1/100	-3,43	1,47	-13,86	1,06
8	9	3c	DQ2,5	IGG 76.8	IgG Negatif	4,3	1,36	2,48	-1,39
12	11	3b	DQ2,5	IGG 2.1	IgG Negatif	-3,23	-7,75	-6,54	-3,93
6	17	3b	DQ2,5	IGG 4.1	IgG 1/100	1,93	213,78	-2,2	-3,55
7	17	3b	DQ2,5	IGG 42.4	IgG 1/100	1,89	-5,57	-4,7	-7,41
11	17	3b	DQ2,5	IGG 9.1	IgG 1/20	29,18	1,16	-1,22	-3,89

*Tip I Diyabeti olan hastalar, Fr: düzenlenmiş kat değişimi

Yaş sıralamasına göre bakıldığında, çocukluk döneminin son yılında olan hastalarda (17 yaş), tablonun daha çok yerleştiği; RUNX 3'ün hem doku hem kanda %100 azaldığı, THEMIS'in ise kanda %100 ve dokuda %66,67 arttığı tespit edilmektedir.

Tablo 22: HLA DQ8 doku grubu hastaların verileri

Hasta No		1		5	
Yaş		9		7	
Cinsiyet		K		K	
Marsh Sınıfı		3b		3a	
HLA		DQB1(03:02)	DQ8	DQB1(03:02)	DQ8
Transglutaminaz Antikoru		IGG 135.9	IGA 188.5	IGG 7.3	IGA 47.9
Anti Endomisyum Antikoru		IgG 1/100	IgA >/100	IgG Negatif	IgA >/100
THEMIS	Kan Fr	-3,43		-1,37	
	Doku Fr	1,47		2,74	
RUNX 3	Kan Fr	-13,86		-1,04	
	Doku Fr	1,06		1,69	

Fr: düzenlenmiş kat değişimi

5. TARTIŞMA

Öncelikle bu araştırma 2020 ve 2021 yıllarında, Covid 19 pandemisinin en şiddetli ve en yoğun yaşandığı dönemde yapılmıştır. Bu sebepten dolayı çalışmaya dahil edilen hastaların şikayetleri ve hastalık şiddeti fazladır. Tüm hastalarda, barsaklarda emilim bozukluğunun göstergesi olarak, demir eksikliği anemisi bulunmuştur. 11 yaşındaki erkek hastada, paratiroid adenomu tespit edilmiş ve Parathormon düzeyi 1761,8 ng/L (referans aralığı 18,5-88,0 ng/L) bulunmuştur ki bu hastanın hem THEMIS hem RUNX 3 ekspresyon değerleri periferik kanda ve dokuda azalmış olarak bulunmuştur. Paratiroid adenomu ile ÇH arasında bir ilişkinin olup olmadığı konusunda literatürde bir çalışma bulunamamıştır.

Aynı şekilde hastaların histokimyasal olarak barsak biyopsi sınıflandırmalarının %100'ü Marsh 3 olarak bulunmuştur. Bu bulgu da aynı şekilde ilerlemiş ve tam olarak oturmuş bir klinik tablonun olduğunu göstermektedir. Hastalar, Biopsi Marsh sınıflandırmasına göre 3a (1)- 3b (8)- ve 3c (3) olarak gruplandırıldı. Oranları sırasıyla 3a (%8) – 3b (%67) – 3c (%25) şeklindedir. Marsh sınıflamasına göre tutulum derecesi arttıkça, otoimmünite bulgusu olan Antiendomisyum antikor miktarının artışına paralel olarak (167); aşırı üretim sonrası RUNX 3 ekspresyonunda azalma beklenmesi olağan sayılabilir ve tanı kriteri olarak düşünülebilir. Tablo.16'da da görüleceği gibi, çalışmamızda, Marsh sınıflamasına göre en şiddetli histokimyasal harabiyetin olduğu 3c grubunda; dokuda RUNX 3, hastaların %100'ünde azalırken, THEMIS de hastaların %100'ünde artmıştır. 3b grubunda bu oranlar RUNX 3 için hastaların %100'ünde azalma ve THEMIS için hastaların %37,5'da artma olarak gelişmiştir. Bu genlerin periferik kandaki değerleri doku ekspresyonlarını çok desteklememekle beraber RUNX 3 için ilişkili izlenmiş olup 3c için azalma olan hasta oranı %66,6 iken, 3b için %62,5 bulunmuştur.

Çocuklarda erken yaşta glutenle karşılaşmanın etkisinin farklı olup olmadığını görmek amacıyla hasta grubu, yaşa göre sıralanmıştır. Tablo.21'de görüldüğü gibi, yaşla ilişkili olarak; HLA dağılımında, serolojik testlerde ve THEMIS ile RUNX 3 gen ekspresyonlarında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim düşünülmezken; 17 yaş gibi çocukluk döneminin son yılında olan hastalarda tablonun daha çok yerleştiği; RUNX 3'ün hem doku hem kanda hastaların %100'ünde azaldığı, THEMIS'in ise

hastaların kanında %100 ve dokusunda %66,67 arttığı tespit edilmektedir. Yaşla beraber kazanılmış immün sistemin daha güçlü hale geldiği varsayılarak, ekspresyonların da tam olarak ortaya çıktığı söylenebilir.

Bununla birlikte, RUNX 3 geninin doku ekspresyonlarında azalma varken, sadece HLA DQ8 doku tipi hastalarda fazla olmamakla beraber bir artış tespit edilmiştir. İnsanlarda RUNX 3'ün bulunduğu 1p36 kromozomal bölge, inflamatuvar barsak hastalığı için hassas bölgedir (158,159). Daha önce yapılmış birçok GWAS araştırmalarında; inflamatuvar barsak hastalığının iki tipi olan ÇH ve Ülseratif Kolit (ÜK) ile ilişkili RUNX 3 lokus varyantı tespit edilmiştir (2,160). Bu bilgiler ışığında, RUNX 3 eksikliği ile ÇH arasında kuvvetli bir bağ söz konusu iken; HLA DQ2,5 ile paralel giden bu bağlantının, HLA DQ8 ile olmaması araştırılması gereken bir bulgudur.

Tablo 22'de de görüleceği gibi Marsh sınıflamasına göre 3a grubu olan tek hastamızda serolojik değerler negatif olup sadece Anti EmA pozitifliğiyle biopsi kararı alınarak kesin tanı konmuştur. Hem THEMIS hem RUNX 3 gen ekspresyonları, HLA DQ8 doku grubu hastalarımızın dokularında artış gösterirken; periferik kandaki ekspresyonları azalmıştır. Doku RUNX 3 artışı, literatürle uyumsuz olan ama sadece DQ8'li hastalarda gördüğümüz; dolayısıyla literatürdeki ilk bulgudur ve ilk kez bu araştırmada gözlenmektedir. Bu hastamızda aynı zamanda Tip I DM de tespit edilmiştir.

Literatürde ÇH'da RUNX 3 ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır. Ancak RUNX 3 ile ilgili yapılan tüm diğer çalışmalarda ise RUNX 3 ekspresyon oranlarında azalma tespit edilmektedir. Hem inflamatuvar barsak hastalıklarında hem de sistemik skleroz gibi romatizmal hastalıklarda çok net RUNX 3 ekspresyon azalması görülmektedir. Tüm bu hastalıkların patofizyolojisinde de RUNX 3 geninin İmmün modülatör etkisinin kalkması ve T lenfosit, B lenfosit, dendritik hücre, NK hücrelerinin gelişim bozukluğuyla beraber proinflamatuvar sitokin salgısının artması sonucu olduğu düşünülmektedir (168). Bu durum ÇH için de geçerli iken, bizim çalışmamızda ilginç olarak ve ilk defa; HLA DQ2,5 için RUNX 3 ekspresyonu azalırken, HLA DQ8 olan hastalarımızın ikisinde de dokuda artmıştır. Bu tespit

araştırılması gereken ve muhtemelen de ÇH'nın İmmün patogenezi ile ilgili olarak, farklı doku tipi gruplarında farklı bir mekanizmanın söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Dybska E. ve arkadaşlarının (168) 2021 yılında yayınlanan araştırmalarında, enflamatuvar barsak hastalıklarında RUNX 3 ekspresyon oranlarının düştüğü ve bunun sonucunda; RUNX 3'ün etkilediği oniki ayrı hücre fonksiyonlarında kayıp meydana geldiğini açıklamıştır. İnterapitelyal lenfosit, Th1, Th2, Th17, Treg, çift pozitif T hücresi, sitotoksik T hücresi, B hücresi, dendritik hücre, naif lenfoid hücre, NK ve makrofajlarda bariz fonksiyon bozukluğu gözlenmiştir.

Aynı şekilde Affandi AJ. ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınlanan makalesinde 1193 Skleroderma (SSc) hastasının RUNX 3 ekspresyonlarını 1387 sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdığında ciddi bir düşüş tespit etmiştir (169). Bunun nedenini araştırmak amacıyla da yaptığı hayvan deneylerinde, RUNX 3'ün yoğun bir metilasyon ve hipoksi nedeniyle fonksiyon kaybına uğradığını açıklamıştır.

Tez çalışmasında elde edilen verilere göre değerlendirdiğimiz ÇH'nın dokularında THEMIS ekspresyonunun hastaların %58,4 arttığını gözlemledik. THEMIS ekspresyonundaki artış miktarı Marsh sınıflamasına göre derece arttıkça yükselmektedir. Ancak dolaşımdaki artış dokudaki artışı tam olarak yansıtmamaktadır. Hastaların periferik kan örneklerinin %50'sinde THEMIS ekspresyonu artmıştır.

Tablo 10'da görüldüğü gibi THEMIS dokuda daha fazla olmak üzere, genelde artış yönünde eğilimli olup; hastalarda ya kan ya dokuda artmıştır. Buna uymayıp hem kan hem dokuda, THEMIS değerleri azalan sadece iki vaka mevcuttur. 2 numaralı hastada bu azalma hafif düzeydeyken; paratiroid adenomu olan 12 nolu hastada THEMIS değerleri, hem kan hem de dokuda belirgin olarak azalmıştır ve bu hasta grubumuzdaki tek erkek hastadır. Ancak THEMIS'teki artışın aksine bu yükselme, İmmünolojik kökeni olabilecek ek patolojiye, yani paratiroid adenomuna bağlanabilir. Üstelik en düşük doku THEMIS ekspresyonu gözlenen hastalardan biridir. Ondan daha düşük olan hasta 9. hasta otoimmün bir süreç olabilecek Tip 1

DM hastasıdır. Dolayısıyla dokuda artmayan, hatta aşırı düşen THEMIS için ek otoimmün sorunlar araştırılmalıdır.

Bondar ve arkadaşları 2014 yılında 36 pediyatrik ÇH'nı 12 sağlıklı çocukla; THEMIS ve PTPRK genlerinin ekspresyonları yönünden karşılaştırmıştır (172). Yeni tanı konan hastaları, 2 yıllık tam glutensiz diyetten sonraki kontrol sonuçları ile ve sağlıklı çocuklarla karşılaştırmıştır. PTPRK geninde anlamlı bir değişiklik bulunmazken, THEMIS geninde hasta - kontrol karşılaştırmasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Fakat tanı anında tespit edilen THEMIS ekspresyonu, iki yıl sonraki sonuçlarla karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak çok anlamlı fark saptanmış ve iki yıl sonraki değerler düşük bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda THEMIS ve RUNX 3 gen ekspresyonlarını ayrıca Transglutaminaz IgA ve IgG antikor düzeylerine ve Anti Endomisyum IgA ve IgG antikor düzeylerine göre de karşılaştırdık. IgA'nın daha çok akut dönem antikoru olduğu düşünüldüğünde IgA>100 olan vaka oranı %58,33'tür. IgG'nin ise geç dönem antikoru olduğu düşünüldüğünde IgG>100 olan vaka oranı %16,66'dır. Hastaların ilk kez tanı aldığı, olasılıkla kronik değil akut vaka olduğu, dolayısıyla IgG'ye oranla daha fazla IgA yüksekliği ile karşılaşmamızın normal olduğu söylenebilir. Her ne kadar p değerleri > 0,05 çıkmış olsa da Tablo 17 – 20'de bu oranlar yorumlanmıştır.

tTG IgA'nın >200 olduğunda; kan THEMIS ekspresyonu hastaların %40'ında artarken, kan RUNX 3 ekspresyonu hastaların %60'ında azalmıştır. Dokuda ise, THEMIS ekspresyonu hastaların %80'inde artarken, doku RUNX 3 ekspresyonu hastaların %100'ünde azalmıştır. tTG IgA=100-200 arasında iken; hem kan hem dokuda RUNX 3 ekspresyonları %50 hastada azalmışken, THEMIS ekspresyonu hastaların %50'sinde artmıştır. tTG IgA=50-100 iken ise; THEMIS kan ekspresyonu hastaların %100'ünde ve doku değerleri hastaların %50'sinde artarken; RUNX 3 her iki yerde hastaların %100'ünde azalmıştır. tTG IgA<50 olduğunda hem kan hem dokuda RUNX 3 ekspresyonları %67 hastada azalmışken, THEMIS %33 hastada artmıştır.

tTG IgG>200 olan bir hasta olup THEMIS ekspresyonu hasta kanında artarken, RUNX 3 doku ekspresyonları azalmıştır. tTG IgG=100-200 arasında yine bir hasta olup sadece kandaki ekspresyonları azalmıştır. tTG IgG=50-100 arasında iki vaka olup, THEMIS kan ve doku ekspresyonları %50 hastada artmışken; RUNX 3 doku ekspresyonu %100 hastada azalmış, kanda ise %100 hastada artmış bulundu. tTG IgG<50'nin altında olduğu hasta sayısı 8 olunca; kan THEMIS ekspresyonunda %50 hastada artma, doku THEMIS ekspresyonunda %62,5 hastada artma, kan RUNX 3 ekspresyonunda %87,5 hastada azalma ve doku RUNX 3 ekspresyonunda %87,5 hastada azalma bulunmuştur.

Anti EmA IgA>1/100 olan hasta sayısı 11 olup sadece IgA negatif, bir hasta bulunmuştur. Kan THEMIS ekspresyonunda %54,54 hastada artış mevcutken, kan RUNX 3 ekspresyonunda %72,72 hastada azalma mevcut bulundu. Dokuda ise THEMIS ekspresyonunda %63,63 hastada artış varken, RUNX 3 ekspresyonunda %83,33 hastada azalma tespit edilmiştir. IgA negatif olan hasta ise paratiroid adenomu olan hasta olup, kan RUNX 3 değeri hariç hepsinde azalma bulunmuştur.

Anti EmA IgG>1/100 olan hasta sayısı 6'dır. Bu vakalarda THEMIS ekspresyonunda hem kan hem dokudaki ekspresyonları hastaların %50'sinde artmıştır. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma ise kanda %66,66 hastada görülürken, dokuda %83,33 hastada olmuştur. Anti EmA IgG<50 olan vaka sayısı üç olup, THEMIS ekspresyonundaki artış hem kan hem dokuda; hastalarda %66,66 oranında bulunmuştur. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma ise kanda %66,66 hastada görülürken, dokuda %100 hastada olmuştur. IgG negatif hasta sayısı da üç olup, THEMIS ekspresyonundaki artış kanda %33,33 hastada görülürken, dokuda %66,66 hastada görülmüştür. RUNX 3 ekspresyonundaki azalma ise, hem kan hem dokuda %66,66 hastada olmuştur.

Doku tipi HLA DQ8 olan 5. hastanın hem THEMIS hem de RUNX 3 ekspresyonları, periferik kanda azalırken, dokuda artmıştır ve serolojik olarak sadece Anti EmA IgA artmıştır. Doku tipi HLA DQ2,5 olan 9. hastanın ise tam tersi THEMIS ve RUNX 3 ekspresyonları periferik kanda artarken dokuda azalmıştır ve hem tTG hem de EmA antikoru IgA ve IgG olarak artmıştır.

Bu çalışmada hastalarımızın tümü, HLA DQ2,5 ve DQ8 doku grubu olarak bulunmuştur. ÇH'nin kalıtımsallığı %80 civarında olduğu ve HLA'nın genetik riske %35 oranında katkı sağladığı tahmin edilmektedir. Bu durumda bu hastalığa duyarlılıkta, daha fazla genetik risk faktörünün ilişkili olması gerekmektedir. Çünkü HLA'ları birebir aynı tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinde yapılan araştırmaya göre; ÇH'nin uyum oranında büyük bir çelişki vardır. Tek yumurta ikizlerinde ÇH görülme oranı %75-86 arasındayken; çift yumurta ikizlerinden birinde hastalık tespit edildiğinde diğer ikizde görülme olasılığı %16-20 arasındadır (24). Bu durumda 12 hastanın 10'unda (%83,3) HLA DQ2,5 ve 2'sinde (%16,7) HLA DQ8 bulunması ve ayrıca tüm hastalarımızın Marsh sınıflamasına göre evre-3 olması; bu doku grubundaki hastaların klinik ve sitopatolojik tabloların daha ağır olmasının sebebi sayılabilir diye düşündürmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada 12 hastadan sadece ikisinde Tip I DM tespit edilmiş olup, toplamdaki oranı %16,6'dır. 5 no.lu ve 7 yaşındaki hastamızda Açlık Kan Şekeri (AKŞ) ilk muayenede 138mg/dL iken; 9 no.lu ve 3 yaşındaki hastamızda AKŞ 114 mg/dL olarak bulunup sonraki daha ayrıntılı tetkiklerle tanı kesinleştirilip insülin başlanmıştır. 5 no.lu hastamızın doku tipi HLA DQ8 ve histopatolojik Marsh sınıfı 3a iken; 9 no.lu hastamızın doku tipi HLA DQ2,5 ve Marsh sınıfı 3b'dir.

Referans	Ülke	N.	Yaş (yıl)	Taranan	Prevalans(%)
Cerutti et al. 2004	Italy	4322	11.8 ± 4.2	AGA+EMA	6.8
Contreas et al. 2004	Italy	357	Children	EMA	7
Sanchez et al. 2005	Germany	281	Children	AGA+EMA	6.4
Araujo et al. 2006	Brasil	354	Children	TG	10.5
Goh et al. 2007	UK	113	Children	EMA+TG+AGA	4.4
Larsson et al. 2008	Sweden	300	< 20	EMA	10
Karavanaki et al. 2009	Greece	144	12.3 ± 4.6	TG	4.8
Djuric et al. 2010	Serbia	121	Mean 10.8	TG	5.79

Bhadada et al. 2011	India	189	10.81 ± 7.3	TG	11.1
Gabriel S et al. 2011	Romani	119	11 ± 4	TG	9.2

Yukarıda görüldüğü gibi yapılan birçok çalışmada; Çölyak Hastalarında Tip I Diabetes Mellitus Hastalığı gelişme prevalansı en çok %11'i geçmemektedir, ancak çalışmamızda bulunan %16,6'lık değerin yüksek bulunması, vakaların az olması ile ilgili olabilir. Bu yüzden daha fazla ve daha geniş katılımlı çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır çünkü farklı ülkeler ve farklı coğrafyalar arasında ciddi farklılıklar vardır. Necati Balamtekin ve arkadaşlarının 2010 yılında 220 çocuk Çölyak hastası üzerinde yaptıkları çalışmada, sadece 9 hastada Tip I Diabetes Mellitus tespit etmiş olup bu oran %4'e denk gelmektedir (171). Ancak 2010 yılından bugüne kadar geçen 12 yıllık süreçte; özellikle dünyamızdaki çevre ve ekolojik dengelerle pandemiler dikkate alındığında, otoimmün bazı hastalıkların prevalansında artış, doğal karşılanabilecektir. Bu durumda, her ne kadar hasta sayısı sınırlı olsa da Tip I DM'un da ortaya çıkmasında HLA grubunun etkili olduğu söylenebilir. Çünkü çalışmamızda 12 hastanın 10'unda (%83,3) HLADQ2,5 ve 2'sinde (%16,7) HLADQ8 bulundu.

Tablo 12'deki THEMIS ekspresyonunun yükselmeleri bozan, hem kan hem dokuda birlikte THEMIS düşüklüğü olan sadece bir hasta bulunmaktadır. Bu hasta Tablo 10'a bakıldığında, anti EmA negatif olan tek hastadır. Tablo 15'e bakıldığında tüm hastaların antiEmA IgA konsantrasyonları 1/100'de bile pozitif olacak kadar yüksekken, sadece bu hastanın bu kuralı bozduğu görülmektedir. Anti EmA serolojik testlerinin anti tTG antikorlarına göre daha hassas olduğu da söylenebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada en büyük sınırlayıcı sebep, biyopsi alma mecburiyetidir. Çocuk hastalarla çalışmak ve özellikle kontrol grubu oluşturmak, biyopsi sebebiyle çok zordur. Bu sınırlamalar nedeniyle çalışmada hasta sayısı düşük kalmıştır.

Yine çalışmanın yapıldığı dönem olan 2020-2021 yıllarında Covid-19 pandemisi de hastane başvurularını azaltmış ve 12 hasta ancak 15 ayda tamamlanabilmiştir.

RUNX 3 gen ekspresyonlarının hem periferik kanda hem de biyopsi materyali olan dokularda azalmış olması, güvenilir ve aynı zamanda noninvaziv birer tanı kriteri olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Aynı zamanda RUNX 3'ün doku ekspresyonlarında, HLA DQ2,5 ile DQ8 hastalarında gözlenen farklılık; çok anlamlıdır. İmmünojenetik mekanizma düşünüldüğünde, deamine edilmiş gluten proteinlerinin; tercihi olarak DQ2,5 ve DQ8 reseptörlerine elektriksel bir çekim ile bağlanmasından daha ileri bir İmmün mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Bu alanda invivo hayvan deneylerine ihtiyaç olduğu söylenebilir. Çünkü DQ2,5 doku grubuna sahip hastalardaki ÇH gelişme mekanizmasından daha farklı ve RUNX 3'ten bağımsız bir mekanizmanın daha var olduğu, DQ8 için düşünülebilir. DQ8 doku grubuna sahip hastalar için farklı bir mekanizmanın söz konusu olup olmadığını anlamak için daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

GWAS çalışmalarının bu denli etkin kullanıldığı günümüzde, hem ÇH'nın non HLA İmmünojenetik mekanizmasının anlaşılması ve hem de noninvaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır. Özellikle İmmün sistemin her aşamasında görev alan çok sayıdaki molekülün İmmün tolerans ve otoimmünite yönünden incelenmesi gerektiği aşikardır.

7.KAYNAKLAR

- 1- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B: Integration of genetic and İmmünological insights in to a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 493–525.
- 2- Dubois PC, Trynka G, Franke L et al: Multiple common variants for celiac disease influencing İmmüne gene expression. *Nat Genet* 2010; 42: 295–302.
- 3- vanHeel DA, Franke L, Hunt KA et al: A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 2007; 39: 827–829.
- 4- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA et al: Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 2011; 43: 1193–1201.
- 5- Lesourne R, Uehara S, Lee J et al: THEMIS, a new T cell specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* 2009; 10: 840–847.
- 6- Fu G, Valle ´e S, Rybakın V et al: THEMIS controls thymocyte selection through modulation of T cell antigen receptor-mediated signalling. *Nat Immunol* 2009; 10: 848–856.
- 7- Brockmeyer C, Paster W, Pepper D et al: T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation Dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem* 2011; 286: 7535–7547.
- 8- Iwata R, Sasaki N, Agui T: Contiguous gene deletion of Ptpnk and THEMIS causes T-helper İmmünodeficiency (thid) in the LEC rat. *Biomed Res* 2010; 31: 83–87.
- 9- D.Levanon, Y.Groner, Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes, *Oncogen* 23 (2004), 4211-4219
- 10- Meresse B, Ripoché J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoİmmüny and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol* 2009; 2: 8-23.
- 11- Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Dig Dis* 2008; 26: 112-120.
- 12- Adams F [trans]. On the Celiac Affection. The Extant Works of Aretaeus, the Cappadocian. London: Sydenham Society; 1856.
- 13- Guandalini S. A Brief History of Celiac Disease. *Impact* 2007; 7: 1-4.
- 14- Heap GA, vanHeel DA. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Semin Immunol* 2009; 21: 346-354.
- 15- Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6036-6059.
- 16- Ün C, Aydođdu S. Çölyak hastalığının moleküler genetik temelleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003; 46: 75-79.

- 17- Megiorni F, Mora B, Bonamico M, et al. HLA-DQ_and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol* 2009; 70: 55-59.
- 18- Soya S, Ün C. Çölyak hastalığındaki moleküler ve genetik gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2014; 57: 274-282
- 19- Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2006; 131:1981-2002
- 20- Chand N, Mihas AA. Celiac Disease Current Concepts in Diagnosis and Treatment. *Journal Clinical Gastroenterology* 2006; 40(1):3-14
- 21- Al-toma A, Verbeek WHM, Mulder CJJ. Update on the Management of Refractory Coeliac Disease. *J Gastrointestinal Liver Disease*.2007; 16(1):57-63
- 22- Eldem A, Kılıçarslan T.A. Çocuk Çölyak Hastalarında HLA DQB1 ve IL-17 Polimorfizmlerin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2019-71
- 23- Trynka G, Wijmenga C, David A vH. A Genetic Perspective on Coeliac Disease, *Trends in Molecular Medicine*, November 2010, Vol. 16, No. 11
- 24- Sollid LM. Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterol*. 1993; 105: 910-22.
- 25- Zhernakova A. *et al.*(2010). Evolutionary and functional analysis of Celiac risk loci reveals SH2B3 as a protective factor against bacterial infection. *Am.J. Hum .Genet.* 86, 970-977
- 26- Bettelli E.*at al.* (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453,1051-1057.
- 27- Pais WP, Duerksen DR, Pettigrew NM, *et al.* How many duodenal biopsy specimens are required to make a diagnosis of celiac disease? *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 1082-7.
- 28- Klein L *at al.*(2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerans induksion. *Nat. Rev. Imm.* 9,833-844.
- 29- Lodei M. *at al.* (2005). Gliadin as a stimulator of doğal responses in Celiac disease. *Mol. Immun.* 42,9130918.
- 30- Nicholas RJG, Oresto A. (2015). THEMIS: a critical TCR signal regülätör for ligand discrimination. *Cur. Op. Imm.* 2015.33 86-92
- 31- G.L. Stritesky, S.C. Jameson, K.A. Hogquist. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol*, 30 (2012), pp. 95-114
- 32- L. Klein, B. Kyewski, P.M. Allen, K.A. Hogquist. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don'tsee). *Nat Rev Immunol*, 14 (2014), pp. 377-391
- 33- N.R.J. Gascoigne, E. Palmer. Signaling in thymic selection. *Curr Opin Immunol*, 23 (2011), pp. 207-212

- 34- G. Fu, V. Rybakin, J. Brzostek, W. Paster, O. Acuto, N.R.J. Gascoigne. Fine-tuning T cell receptor signaling to control T cell development. *Trends Immunol*, 35 (2014), pp. 311-318
- 35- A. Singer, S. Adoro, J.H. Park. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol*, 8 (2008), pp. 788-801
- 36- M. Saini, C. Sinclair, D. Marshall, M. Tolaini, S. Sakaguchi, B. Seddon. Regulation of Zap70 expression during thymocyte development enables temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Sci Signal*, 3 (2010), p. ra23
- 37- M.A. Daniels, E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. W erlen, G.A. Hollander, N.R.J. Gascoigne, E. Palmer. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature*, 444 (2006), pp. 724-729
- 38- D. Naeher, M.A. Daniels, B. Hausmann, P. Guillaume, I. Luescher, E. Palmer. A constant affinity threshold for T cell tolerance. *J ExpMed*, 204 (2007), pp. 2553-2559
- 39- O. Stepanek, A.S. Prabhakar, C. Osswald, C.G. King, A. Bulek, D. Naeher, M. Beaufils-Hugot, M.L. Abanto, V. Galati, B. Hausmann, *et al.* Co receptor scanning by the T cell receptor provides a mechanism for T cell tolerance. *Cell*, 159 (2014), pp. 333-345
- 40- T.W. McKeithan. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (1995), pp. 5042-5046
- 41- G. Altan-Bonnet, R.N. Germain. Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses. *PLoS Biol*, 3 (2005), p. e356
- 42- J. Das, M. Ho, J. Zikherman, C. Govern, M. Yang, A. Weiss, A.K. Chakraborty, J. P. Roose. Digital signaling and hysteresis characterizes activation in lymphoid cells. *Cell*, 136 (2009), pp. 337-351
- 43- O. Acuto, V. DiBartolo, F. Micheli. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 8 (2008), pp. 699-712
- 44- C.Marianne, Pedros C. *et al.* A Spontaneous Mutation of the Rat THEMIS Gene Leads to Impaired Function of Regulatory T Cells Linked to Inflammatory Bowel Disease. *PLoS Genet*. January 2012. Vol 8. Issue 1 e1002461.
- 45- R. Lesourne, S. Uehara, J. Lee, K.D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N.P. Weng, K.F. Wildt, L. Wang, *et al.* THEMIS, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol*, 10 (2009), pp. 840-847
- 46- M.S. Patrick, H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, *et al.* Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (2009), pp. 16345-16350

- 47- A.L. Johnson, L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S.Y. Choi, T.L. Crockford, T. Lambe, H. Domasch, E.M. Kucharska, L. Zheng, *et al.* THEMIS is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nat Immunol*, 10 (2009), pp. 831-839
- 48- K. Kakugawa, T. Yasuda, I. Miura, A. Kobayashi, H. Fukiage, R. Satoh, M. Matsuda, H. Koseki, S. Wakana, H. Kawamoto, *et al.* A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Mol Cell Biol*, 29 (2009), pp. 5128-5135
- 49- C. Brockmeyer, W. Paster, D. Pepper, C.P. Tan, D.C. Trudgian, S. McGowan, G. Fu, N.R.J. Gascoigne, O. Acuto, M. Salek. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation Dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *J Biol Chem*, 286 (2011), pp. 7535-7547
- 50- R. Lesourne, E. Zvezdova, K.D. Song, D. ElKhoury, S. Uehara, V.A. Barr, L.E. Samelson, P.E. Love. Interchange ability of THEMIS1 and THEMIS2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol*, 189 (2012), pp. 1154-1161
- 51- W. Paster, C. Brockmeyer, G. Fu, P.C. Simister, B. deWet, A. Martinez-Riano, J.A. Hoerter, S.M. Feller, C. Wulfig, N.R.J. Gascoigne, *et al.* GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol*, 190 (2013), pp. 3749-3756
- 52- T. Okada, T. Nitta, K. Kaji, A. Takashima, H. Oda, N. Tamehiro, M. Goto, T. Okamura, M.S. Patrick, H. Suzuki. Differential function of THEMIS CABIT domains during T cell development. *PLoS One*, 9 (2014), p. e89115
- 53- E. Zvezdova, J. Lee, D. El-Khoury, V. Barr, I. Akpan, L. Samelson, P.E. Love. In vivo functional mapping of the conserved protein domains within murine THEMIS1. *Immunol Cell Biol*, 92 (2014), pp. 721-728
- 54- G. Fu, J. Casas, S. Rigaud, V. Rybakina, F. Lambolez, J. Brzostek, J.A.H. Hoerter, W. Paster, O. Acuto, H. Cheroutre, *et al.* THEMIS sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature*, 504 (2013), pp. 441-445
- 55- W. Paster, A.M. Bruger, K. Katsch, C. Gregoire, R. Roncagalli, G. Fu, N.R.J. Gascoigne, K. Nika, A. Cohnen, S.M. Feller, *et al.* A THEMIS:SHP1 complex promotes T-cell survival. *EMBO J*, 34 (2015), pp. 393-409
- 56- J. Zhang, A. Shehabeldin, L.A. daCruz, J. Butler, A.K. Somani, M. McGavin, I. Kozieradzki, A.O. dosSantos, A. Nagy, S. Grinstein, *et al.* Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott–Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*, 190 (1999), pp. 1329-1342
- 57- D.R. Plas, C.B. Williams, G.J. Kersh, L.S. White, J.M. White, S. Paust, T. Ulyanova, P.M. Allen, M.L. Thomas. Cutting edge: the tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection. *J Immunol*, 162 (1999), pp. 5680-5684

- 58- J.D. Carter, B.G. Neel, U. Lorenz. The tyrosine phosphatase SHP-1 influences thymocyte selection by setting TCR signaling thresholds. *Int Immunol*, 11 (1999), pp. 1999-2014
- 59- I. Stefanova, B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W.E. Biddison, R.N. Germain. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol*, 4 (2003), pp. 248-254
- 60- S.C. Jameson, K.A. Hogquist, M.J. Bevan. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol*, 13 (1995), pp. 93-126
- 61- Ito Y, Bae SC, Chuang LS. The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:81–95.
- 62- Okuda T, vanDeursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84:321–30.
- 63- Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian Hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2008; 9:129–36.
- 64- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX 2. *Cell Tissue Res* 2010; 339:189–95.
- 65- deBruijn MF, Speck NA. Core-binding factors in hematopoiesis and Immune function. *Oncogene* 2004; 23:4238–48.
- 66- Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M et al. Purification of a Mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyoma virus enhancer. *J Virol* 1990; 64:4808–19.
- 67- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3444–9.
- 68- Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T et al. Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9:541–52.
- 69- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004; 10:299–304.
- 70- Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* 2006; 25:929–39.
- 71- Jacob B, Osato M, Yamashita N, Wang CQ, Taniuchi I, Littman DR et al. Stem cell exhaustion due to Runx 1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood* 2010; 115:1610–20.
- 72- Wang CQ, Jacob B, Nah GS, Osato M. Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44:275–86.

- 73- Wang CQ, Krishnan V, Tay LS, Chin DW, Koh CP, Chooi JY et al. Disruption of Runx 1 and Runx 3 leads to bone marrow failure and leukemia predisposition due to transcriptional and DNA repaired effects. *Cell Rep* 2014; 8:767–82.
- 74- Satpathy AT, Briseno CG, Cai X, Michael DG, Chou C, Hsiung S et al. Runx 1 and Cbfb regulate the development of Flt3+ dendritic cell progenitors and restrict myeloproliferative disorder. *Blood* 2014; 123:2968–77.
- 75- Wang CQ, Chin DW, Chooi JY, Chng WJ, Taniuchi I, Tergaonkar V et al. Cbfb deficiency results in differentiation blocks and stem/progenitor cell expansion in hematopoiesis. *Leukemia* 2015; 29:753–7.
- 76- Collins A, Littman DR, Taniuchi I. RUNX proteins in transcription factor Networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:106–15.
- 77- Satake M, Nomura S, Yamaguchi-Iwai Y, Takahama Y, Hashimoto Y, Niki M et al. Expression of the Runt domain-encoding PEBP2 a genes in T cells during thymic development. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1662–70.
- 78- North TE, Stacy T, Matheny CJ, Speck NA, de Bruijn MF. Runx 1 is expressed in adult Mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells* 2004; 22:158–68.
- 79- Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002; 111:621–33.
- 80- Lorschach RB, Moore J, Ang SO, Sun W, Lenny N, Downing JR. Role of RUNX 1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX 1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* 2004; 103:2522–9.
- 81- Hernandez-Munain C, Krangel MS. Regulation of the T-cell receptor d enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14:473–83.
- 82- Lauzurica P, Zhong XP, Krangel MS, Roberts JL. Regulation of T cell receptor d gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J Exp Med* 1997; 185:1193–201.
- 83- Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, Grosschedl R. Assembly and function of a TCR a enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein–protein interactions. *Genes Dev* 1995; 9:995–1008.
- 84- Cieslak A, Le Noir S, Trinquand A, Lhermitte L, Franchini DM, Villarese P et al. RUNX 1-dependent RAG1 deposition in stgates human TCR-d locus rearrangement. *Exp Med* 2014; 211:1821–32.
- 85- Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C et al. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* 2008; 319:822–5.
- 86- Steinke FC, Yu S, Zhou X, He B, Yang W, Zhou B et al. TCF-1 and LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4+ T cell fate and interact with Runx 3 to silence Cd4 in CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2014; 15:646–56.

- 87- Collins A, Hewitt SL, Chaumeil J, Sellars M, Micsinai M, Allinne J et al. RUNX transcription factor-mediated association of Cd4 and Cd8 enables coordinate gene regulation. *Immunity* 2011; 34:303–14.
- 88- Djuretic IM, Cruz-Guilloty F, Rao A. Regulation of gene expression in peripheral T cells by Runx transcription factors. *Adv Immunol* 2009; 104:1–23.
- 89- Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx 3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007; 8:145–53.
- 90- Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, Muroi S, Kuroda M, Hatam F et al. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf b binding to the Il4 silencer. *J Exp Med* 2007; 204:1749–55.
- 91- Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG et al. Runx 3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 2009; 206:51–9.
- 92- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and Immune tolerance. *Cell* 2008; 133:775–87.
- 93- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235–8.
- 94- Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H et al. Indispensable role of the Runx 1-Cbfb transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* 2009; 31:609–20.
- 95- Rudra D, Egawa T, Chong MM, Treuting P, Littman DR, Rudensky AY. Runx-CBFB complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10:1170–7.
- 96- Klunker S, Chong MM, Mantel PY, Palomares O, Bassin C, Ziegler M et al. Transcription factors RUNX 1 and RUNX 3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 2009; 206:2701–15.
- 97- Bruno L, Mazzarella L, Hoogenkamp M, Hertweck A, Cobb BS, Sauer S et al. Runx proteins regulate Foxp3 expression. *J Exp Med* 2009; 206:2329–37.
- 98- Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx 1. *Nature* 2007; 446:685–9.
- 99- Brenner O, Levanon D, Negreanu V, Golubkov O, Fainaru O, Woolf E et al. Loss of Runx 3 function in leukocytes is associated with spontaneously developed colitis and gastric mucosal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:16016–21.
- 100- Fainaru O, Shseyov D, Hantisteanu S, Groner Y. Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx 3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:10598–603.

- 101- Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007; 19:409–17.
- 102- Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 2006; 441:231–4.
- 103- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179–89.
- 104- Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014; 13:1174–81.
- 105- Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, Sunshine MJ, Pierani A, Brenner-Morton S et al. Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 2000; 288:2369–73.
- 106- Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx 1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2008; 9:1297–306.
- 107- Ramesh R, Kozhaya L, McKeivitt K, Djuretic IM, Carlson TJ, Quintero MA et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 2014; 211:89–104.
- 108- Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, Cui K, Zhao K, Pucsek AB et al. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- γ producing T helper 17 cells. *Immunity* 2014; 40:355–66.
- 109- Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, Jin H, Lee Y, Awasthi A et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 2013; 496:461–8.
- 110- Kleiweietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 2013; 496:518–22.
- 111- Denning TL, Granger SW, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, Zhang W et al. Mouse TCR α +CD8 α intraepithelial lymphocytes Express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol* 2007; 178:4230–9.
- 112- Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:445–56.
- 113- Pobeziński LA, Angelov GS, Tai X, Jeurling S, Van Laethem F, Feigenbaum L et al. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* 2012; 13:569–78.
- 114- Reis BS, Rogoz A, Costa-Pinto FA, Taniuchi I, Mucida D. Mutual expression of the transcription factors Runx 3 and ThPOK regulates intestinal CD4 $^{+}$ T cell immunity. *Nat Immunol* 2013; 14:271–80.
- 115- Klose CS, Blatz K, d’Hargues Y, Hernandez PP, Kofoed-Nielsen M, Ripka JF et al. The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection

- and controls CD8a⁺ intraepithelial lymphocyte development. *Immunity* 2014; 41:230–43.
- 116- Reis BS, HoytemavanKonijnenburg DP, Grivennikov SI, Mucida D. Transcription factor T-bet regulates intraepithelial lymphocyte functional maturation. *Immunity* 2014; 41:244–56.
- 117- Egawa T, Littman DR. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat Immunol* 2008; 9:1131–9.
- 118- Monteiro M, Graca L. iNKT cells: doğal lymphocytes with a diverse response. *Crit Rev Immunol* 2014; 34:81–90.
- 119- Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L et al. Genetic evidence supporting selection of the Va14i NKT cell lineage from double positive thymocyte precursors. *Immunity* 2005; 22:705–16.
- 120- Tachibana M, Tenno M, Tezuka C, Sugiyama M, Yoshida H, Taniuchi I. Runx 1/Cbfb2 complexes are required for lymphoid tissue inducer cell differentiation at two developmental stages. *J Immunol* 2011; 186:1450–7.
- 121- Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A et al. Over expression of natural killer T cells protects Va14- Ja281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188:1831–9.
- 122- Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012; 336:489–93.
- 123- Woolf E, Brenner O, Goldenberg D, Levanon D, Groner Y. Runx 3 regulates dendritic epidermal T cell development. *Dev Biol* 2007; 303:703–14.
- 124- Grueter B, Petter M, Egawa T, Laule-Kilian K, Aldrian CJ, Wuerch A et al. Runx 3 regulates integrin α E/CD103 and CD4 expression during development of CD4⁺/CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2005; 175:1694–705.
- 125- Sharp LL, Jameson JM, Witherden DA, Komori HK, Havran WL. Dendritic epidermal T-cell activation. *Crit Rev Immunol* 2005; 25:1–18.
- 126- Shi MJ, Stavnezer J. CBF a3 (AML2) is induced by TGF- β 1 to bind and activate the Mouse germline Ig a promoter. *J Immunol* 1998; 161:6751–60.
- 127- Zhang Y, Derynck R. Transcriptional regulation of the transforming growth factor β -inducible Mouse germline Ig a constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J Biol Chem* 2000; 275:16979–85.
- 128- Watanabe K, Sugai M, Nambu Y, Osato M, Hayashi T, Kawaguchi M et al. Requirement for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF- β 1 and retinoic acid signaling. *J Immunol* 2010; 184:2785–92.
- 129- Fainaru O, Woolf E, Lotem J, Yarmus M, Brenner O, Goldenberg D et al. Runx 3 regulates mouse TGF- β -mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J* 2004; 23:969–79.

- 130- Maier H, Ostraat R, Gao H, Fields S, Shinton SA, Medina KL et al. Early B cell factor cooperates with Runx 1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol* 2004; 5:1069–77.
- 131- Martensson A, Xie XQ, Persson C, Holm M, Grundstrom T, Martensson IL. PEBP2 and c-myb sites crucial for k5 co reenhancer activity in pre-B cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3165–74.
- 132- Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:421–34.
- 133- Ehrhardt GR, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Wang JY, Cooper MD. Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. *J Exp Med* 2008; 205:1807–17.
- 134- Whiteman HJ, Farrell PJ. RUNX expression and function in human B cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006; 16:31–44.
- 135- Withers DR. Lymphoid tissue inducer cells. *Curr Biol* 2011; 21: R381–2.
- 136- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9:503–10.
- 137- Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:243–54.
- 138- Talebian L, Li Z, Guo Y, Gaudet J, Speck ME, Sugiyama D et al. T-lymphoid, megakaryocyte, and granulocyte development are sensitive to decreases in CBFb dosage. *Blood* 2007; 109:11–21.
- 139- Guo Y, Maillard I, Chakraborti S, Rothenberg EV, Speck NA. Core binding factors are necessary for natural killer cell development and cooperate with Notch signaling during T-cell specification. *Blood* 2008; 112:480–92.
- 140- Ohno S, Sato T, Kohu K, Takeda K, Okumura K, Satake M et al. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN- γ expression during NK cell differentiation. *Int Immunol* 2008; 20:71–9.
- 141- Hayashi K, Natsume W, Watanabe T, Abe N, Iwai N, Okada H et al. Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single-positive T cells. *J Immunol* 2000; 165:6816–24.
- 142- Levanon D, Negreanu V, Lotem J, Bone KR, Brenner O, Leshkowitz D et al. Transcription factor Runx 3 regulates interleukin-15-dependent natural killer cell activation. *Mol Cell Biol* 2014; 34:1158–69.
- 143- Chopin M, Seillet C, Chevrier S, Wu L, Wang H, Morse HC 3rd et al. Langerhans cells are generated by two distinct PU.1-dependent transcriptional networks. *J Exp Med* 2013; 210:2967–80.
- 144- Puig-Kroger A, Aguilera-Montilla N, Martinez-Nunez R, Dominguez-Soto A, Sanchez-Cabo F, Martin-Gayo E et al. The novel RUNX 3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and down regulates IL-8 expression. *Immunobiology* 2010; 215:812–20.

- 145- Mukai K, BenBarak MJ, Tachibana M, Nishida K, Karasuyama H, Taniuchi I et al. Critical role of P1-Runx 1 in Mouse basophil development. *Blood* 2012; 120:76–85.
- 146- Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM et al. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBFa2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 1996; 16:1231–40.
- 147- Himes SR, Cronau S, Mulford C, Hume DA. The Runx 1 transcription factor controls CSF-1-dependent and-independent growth and survival of macrophages. *Oncogene* 2005; 24:5278–86.
- 148- Dominguez-Soto A, Relloso M, Vega MA, CorbiAL, Puig-Kroger A. RUNX 3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters. *Immunobiology* 2005; 210:133–9.
- 149- Estecha A, Aguilera-Montilla N, Sanchez-MateosP, Puig-Kroger A. RUNX 3 regulates intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) expression during macrophage differentiation and monocyte extravasation. *PLoS ONE* 2012; 7:e33313.
- 150- Puig-Kroger A, Sanchez-Elsner T, Ruiz N, Andreu EJ, Prosper F, Jensen UB et al. RUNX/AML and C/EBP factors regulate CD11a integrin expression in myeloid cells through overlapping regulatory elements. *Blood* 2003; 102:3252–61.
- 151- Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolksac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 117:145–52.
- 152- Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S. Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx 1. *J Neurosci* 2012; 32:11285–98.
- 153- Bowcock AM. The genetics of psoriasis and autoImmunity. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6:93–122.
- 154- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002; 32:666–9.
- 155- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF et al. Safety, activity, and Immüne correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443–54.
- 156- Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, Chamian F, Gordon D et al. A putative RUNX 1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* 2003; 35:349–56.
- 157- Tokuhiko S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T et al. An intronic SNP in a RUNX 1 binding site of SLC22A4, encoding anorganic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 35:341–8.

- 158- Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7502–7.
- 159- Parkes M, Jewell D. Ulcerative colitis and Crohns disease: molecular genetics and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 2001; 2001:1–18.
- 160- Weersma RK, Zhou L, Nolte IM, van der Steege G, vanDullemen HM, Oosterom E et al. Runt-related transcription factor 3 is associated with ulcerative colitis and shows epistasis with solute carrier family 22, members 4 and 5. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1615–22.
- 161- Haley KJ, Lasky-Su J, Manoli SE, Smith LA, Shahsafaei A, Weiss ST et al. RUNX transcription factors: association with pediatric asthma and modulated by maternal smoking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301:L693–701.
- 162- Taniuchi I. Transcriptional regulation in helper versus cytotoxic-lineage decision. *Curr Opin Immunol* 2009; 21:127–32.
- 163- Cerutti A, Puga I, Cols M. Doğal control of B cell responses. *Trends Immunol* 2011; 32:202–11.
- 164- Hor YT, Voon DC, Koo JK, Wang H, Lau WM, Ashktorab H et al. A role for RUNX 3 in inflammation-induced expression of IL23A in gastric epithelial cells. *Cell Rep* 2014; 8:50–8.
- 165- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201:233–40.
- 166- Brillantes M, Beaulieu AM. Transcriptional control of natural killer cell differentiation. 2018 John Wiley&Sons Ltd, *Immunology*, 156, 111–119
- 167- Tunç N, Şahin A , Orhan S , Yalnız M , Demirel U , Poyrazoglu OK , Bahçecioglu IH. Celiac disease: 5-year follow-up antibody-pathology correlation. *Endoscopy* 2016; 24(2): 43-46
- 168-Dybska E, A.T.Alex,RDuclaux-Loras, W Jarosław, N Jan K. Waiting in the wings: RUNX 3 reveals hidden depths of İmmune regulation with potential implications for inflammatory bowel disease. *Scand .J. Immunology*. 2021. <https://doi.org/10.1111/sji.13025>
- 169- Affandi AJ, Carvalheiro T, Ottria A, et al. Low RUNX 3 expression alters dendritic cell function in patients with systemic sclerosis and contributes to enhanced fibrosis. *Ann Rheum Dis*.2019;78(9):1249-1259.
- 170-Camarca et al. *Italian Journal of Pediatrics* 2012, 38:10 <http://www.ijponline.net/content/38/1/10>
- 171- N Balamtekin, N Uslu, G Baysoy, Y Usta, H Demir, İ N Saltık-Temizel, H Özen, F Gürakan, A Yüce. The presentation of celiac disease in 220 Turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2010; 52: 239-244

- 172-C Bondar, L Plaza-Izurieta, N Fernandez-Jimenez, I Irastorza, S Withoff, CEGEC6, C Wijmenga, F Chirido, JR Bilbao. THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge. *European Journal of Human Genetics* (2014) 22, 358–362
- 173-Voon DC, Hor YT, Ito Y. The RUNX complex: reaching beyond haematopoiesis into Immunity. *Immunology* 2015; 146:523–36.



ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında İskeçe/Yunanistan'da doğdum. İlk öğrenimimi Yunanistan'da tamamladıktan sonra 1976 yılında İzmir'e geldim. Ortaokul, lise ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesini burada bitirdim. Kahramanmaraş, Elbistan'daki mecburi hizmetimden sonra, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye Kliniğinde göreve başladım. 2005 yılından itibaren Başhekim Yardımcılığı olarak başladığım yöneticilik dönemimde, Başhekimlik, İdari Başkanlık ve Sağlık Müdür Yardımcılığı gibi görevlerde bulundum. 2010 yılında Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesinden mezun olup Okan Üniversitesinde Sağlık Yönetimi Yüksek Lisansı yaptım. Halen Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Doku Tipleme laboratuvarında kadrolu olarak, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında doktora eğitimi almaktayım.