

T.C.

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ÇÖLYAK HASTALARINDA CTLA-4 VE FOXP3 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Abdullah Said YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ**

2021- İZMİR

T.C.

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ÇÖLYAK HASTALARINDA CTLA-4 VE FOXP3 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Abdullah Said YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2020-TYL-SABE-003 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2021- İZMİR

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip 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/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- **Tezimin/Raporumun Ekim 2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum. (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

Abdullah Said YILMAZ

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 zgn olduğunu, Tez Danışmanım Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Abdullah Said YILMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimde tüm süreç boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana büyük kazanımlar sağlayan, zor zamanlarımda bana destek olan, anlayışı ve sonsuz sabrından dolayı değerli danışmanım Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim PİRİM'e, Prof. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde her aşamada yanımda olan bana çok büyük destek veren çok değerli arkadaşlarım Aslı ELDEM'e, H. İlayhan KARAHAN ÇÖVEN'e ve tezimle ilgili düzeltmelerde bana destek olduğu için Burcu ÇERÇİ'ye teşekkür ederim.

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Gastroenteroloji ile İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanı Prof. Dr. Maşallah BARAN'a örneklerin toplanması aşamasında yardımcı olmasından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Koordinatörlüğü'ne (BAP) yüksek lisans tez desteği verdiklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm süreçte bana her türlü desteği sağlayan başta babam olmak üzere aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

ABDULLAH SAİD YILMAZ

ÇÖLYAK HASTALARINDA CTLA-4 VE FOXP3 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

İzmir,2021

Giriş ve Amaç: Çölyak hastalığı, genetik yatkınlığı olan kişilerde gluten alımıyla tetiklenen otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın gelişiminden sorumlu olan başlıca çevresel faktör glutendir ve tek tedavi yöntemi glutensiz beslenmedir. Hastalığın karakteristik özelliği mukozal lezyonlar, yani villus atrofi ve kript hiperplazisidir. Hastalığın tanısı, duodenal biyopsi ile saptanan mukozal değişikliklerin kombinasyonu ve serolojik testlerin pozitifliği ile belirlenir. İmmün toleransta önemli rolleri olan *CTLA-4* ve *Foxp3* genlerindeki polimorfizmlerin otoimmün bir hastalık olan Çölyak ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda hasta ve sağlıklı kontrol grubunda *CTLA-4* +49 A/G (rs231775) ve *Foxp3* -3279 C/A (rs3761548) polimorfizmleri araştırılarak çölyak hastalığı ile ilişkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal-Metod: 18 yaşından küçük 125 çölyak hastası ve 100 sağlıklı kontrolün polimeraz zincir reaksiyonlu restriksiyon (parça) polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile *CTLA-4* genindeki +49 A/G ve *Foxp3* genindeki -3279 C/A tek nükleotit polimorfizmleri araştırıldı.

Bulgular: Hasta ve kontrol grubu arasında *CTLA-4* +49 A/G ve *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmleri karşılaştırıldığında her iki gende de genotip ve allel frekansı açısından fark yoktu ($p>0,05$). *CTLA-4* geni için hasta grubunda A ve G allel frekansının daha yüksek olduğu saptandı. *Foxp3* geni için hasta grubunda A ve C allel frekansının daha yüksek olduğu bulundu.

Sonuç: Çocuk çölyak hastalarında *CTLA-4* +49 A/G ve *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmlerini ülkemizde ilk olarak araştırdığımız çalışmamızda her iki gen polimorfizmi için de anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$). Her iki gende de hastalık ile ilişkilendirilen A allel frekansı literatürle uyumlu olarak daha fazlaydı. Ayrıca hastalarda *Foxp3* geni -3279 C/A polimorfizminde risk alleli incelendiğinde anlamlı bulundu ($p=0,03$). *CTLA-4* ve *Foxp3* genlerinin ÇH patogenezindeki rollerinin belirlenmesi için ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çölyak Hastalığı, Gluten, *CTLA-4* polimorfizm, *Foxp3* polimorfizm



ABSTRACT

YILMAZ ABDULLAH SAİD

INVESTIGATION OF CTLA-4 AND FOXP3 GENE POLYMORPHISMS IN CELIAC PATIENTS

MSc in Medical Biology and Genetic

İzmir,2021

Introduction and Purpose: Celiac disease is an autoimmune disease triggered by gluten intake in people with a genetic predisposition. The main environmental factor responsible for the development of the disease is gluten and the only treatment method is gluten-free diet. The characteristic feature of the disease is mucosal lesions, villus atrophy and crypt hyperplasia. The diagnosis of the disease is determined by the combination of mucosal changes detected by duodenal biopsy and positivity of serological tests. It is thought that polymorphisms in CTLA-4 and Foxp3 genes, which have important roles in immune tolerance, may be associated with Celiac disease, an autoimmune disease. In our study, it was aimed to investigate CTLA-4 +49 A / G (rs231775) and Foxp3 -3279 C / A (rs3761548) polymorphisms in the patient and healthy control group and to examine their relationship with celiac disease.

Materials and Methods: The single nucleotide polymorphisms of +49 A/G in CTLA-4 gene and -3279 C/A in Foxp3 gene were investigated by polymerase chain reaction restriction polymorphism (PCR-RFLP) method in 125 pediatric celiac patients and 100 healthy controls.

Findings: When CTLA-4 + 49 A / G and Foxp3 -3279 C / A polymorphisms were compared between the patient and control groups, there was no difference in genotype and allele frequency in both genes ($p > 0.05$). It was found that the frequency of A and G alleles was higher in the patient group for the CTLA-4 gene. For the Foxp3 gene, the frequency of A and C alleles was found to be higher in the patient group.

Result: In our study in which we investigated CTLA-4 +49 A/G and Foxp3 -3279 C/A polymorphisms in pediatric celiac patients for the first time in our country, no

significant relationship was found for both gene polymorphisms ($p > 0.05$). In both genes, the frequency of the A allele associated with the disease was higher, consistent with the literature. In addition, the Foxp3 gene -3279 C / A polymorphism in patients was found to be significant when the risk allele was examined ($p = 0.03$). Further studies are needed to determine the roles of CTLA-4 and Foxp3 genes in CD pathogenesis.

Keywords: Celiac Disease, Gluten, CTLA-4 polymorphism, Foxp3 polymorphism



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası.....	i
Yayımlama ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı.....	ii
Etik Beyan.....	iii
Teşekkür.....	iv
Özet.....	v
Abstract.....	vii
İçindekiler.....	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	xii
Şekiller Dizini.....	xvi
Tablolar Dizini.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	2
2.1. Çölyak Hastalığı.....	2
2.1.1. Tarihçe.....	2
2.1.2. Epidemiyoloji.....	2
2.1.3. Mortalite.....	3
2.1.4. Patogenez.....	3
2.1.4.1. Yaş ve Cinsiyet.....	3
2.1.4.2. Gluten.....	4
2.1.4.3. Enfeksiyonlar ve Mikrobiyota.....	5
2.1.4.4. Genetik.....	6
2.1.5. Histopatoloji.....	7
2.1.6. Klinik Sınıflandırma.....	8
2.1.6.1. Klasik Form:.....	8
2.1.6.2. Non-klasik Form.....	8
2.1.6.3. Subklinik Form:.....	9
2.1.6.4. Potansiyel Form:.....	9
2.1.6.5. Refrakter Form:.....	9
2.1.7. Çölyak Hastalığının Tanısı.....	9

2.2. İmmün Tolerans ve Otoimmünite.....	10
2.2.1. Merkezi Tolerans.....	10
2.2.2. Periferik Tolerans.....	11
2.2.2.1. Anerji.....	12
2.2.2.2. Baskılama.....	12
2.2.2.3. Delesyon (Apoptoz).....	12
2.2.3. Düzenleyici T Hücreleri.....	12
2.2.4. İnflamatuar Sitokinler.....	14
2.2.5. Çölyak Hastalığının İmmünolojik Mekanizması.....	15
2.3. Polimorfizmler.....	16
2.4. <i>Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4</i>	17
2.5. <i>Forkhead Box P3</i>	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi.....	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	23
3.4. Çalışma Materyali.....	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	23
3.6. Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	24
3.6.2. Deneysel Çalışmalar.....	25
3.6.2.1. Nanodropta Ölçüm.....	25
3.6.2.2. <i>CTLA-4</i> Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
3.6.2.2.1. Primer Dizaynı.....	26
3.6.2.3. <i>Foxp3</i> Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
3.6.2.3.1. Primer Dizaynı.....	27
3.6.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
3.6.2.5. <i>CTLA-4</i> Amplikonlarının Restriksiyon Enzimi ile Kesimi.....	28
3.6.2.5.1. Agaroz Jel Görüntüsünü Değerlendirme.....	28
3.6.2.6. <i>Foxp3</i> Amplikonlarının Restriksiyon Enzimi ile Kesimi.....	29
3.6.2.6.1. Agaroz Jel Görüntüsünü Değerlendirme.....	29

4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	46
EKLER.....	



Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

α : Alfa

AP-1: Aktivatör Protein 1

ASH: Antijen Sunucu Hücre

ATF1: Aktive edici Transkripsiyon Faktörü 1

β : Beta

γ : Gama

CBF β : Çekirdek Bağlayıcı Faktör Beta

CD: Farklılaşma Kümesi

CD49b: İntegrin Alfa-2

CNS: Korunmuş Kodlamayan Sekanslar

CREB: Siklik amp-Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein

CTLA-4: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen

ÇH: Çölyak Hastalığı

DH: Dendritik Hücreler

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DNMT1: DNA Metiltransferaz 1

DPG: Deamide Gliadin Peptid

DTG-2: Doku Transglutaminazı

ELISA: Enzim ile İlişkili İmmünolojik Test

EmA: Anti-endomisyal Antikor

ESPGHAN: Avrupa Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Topluluğu

ETS1: ETS proto-onkogen 1

FasL: Fas Ligandı

FOXO1/3: Forkhead boxO 1/3

Foxp3: Fork Head Box P3

GWAS: Genom-Çaplı İlişki Çalışmaları

HLA: İnsan Lökosit Antijenleri

HP2: Haptoglobin 2

ICOS: İndüklenebilir T-hücre Kostimülatörü

IEL: İntraepitelyal Lenfositler

IFN- γ : İnterferon Gama

Ig: İmmunoglobulin

IL: İnterlökin

IL18R1: İnterlökin 18 Reseptör 1

IL18RAP: İnterlökin 18 Reseptör Yardımcı Proteini

IPEX: Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome

iTreg/pTreg: İndüklenmiş/Periferik Düzenleyici T Hücreleri

kDA: Kilodalton

LAG-3: Lenfosit Aktivasyon Geni 3

LP: Lamina Propia

MAGI2: Membran İlişkili Guanilat Kinaz

MBD2: Metil-CpG Bağlayıcı Domain Proteini 2

MHC: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi

MMP: Matriks Metaloproteinazlar

mTEC: Medüller Timik Epitel Hücreleri

MYO9B: Miyosin IXB

NFAT: Aktive Edilmiş T Hücrelerinin Nükleer Faktörü

non-HLA: HLA ile ilişkili olmayan

nTreg/tTreg: Doğal/Timik Düzenleyici T Hücreleri

PARD3: Par-3 Ailesi Hücre Polarite Regülatörü 3

PCR: Polimerize Zincir Reaksiyonu

PD-1: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini 1

RFLP: Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Polimorfizmi

RUNX1: Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 1

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

STAT5: Transkripsiyon 5'in Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatörü

STR: Kısa Tandem Tekrarlar

T1DM: Tip I Diyabet

TBE: Tris-Boric EDTA

TCR: T Hücre Reseptörü

TET: On-On bir Translokasyon

TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

Th1: Yardımcı T tip-1 Hücreler

Th17: Yardımcı T tip-17 Hücreler

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü Alfa

Tr1: Tip I Düzenleyici T Hücreleri

TRAs: Doku-Kısıtlı Antijenler

Treg: Düzenleyici/Regülatör T Hücreleri

UTR: Çevrilmemiş Bölge

UV: Morötesi

VNTR: Değişken Sayıda Tandem Tekrarlar



Şekiller Dizini

Şekil 1: ÇH Patogenezindeki mekanizmalar	3
Şekil 2: Self tolerans ve otoimmünite arasındaki denge ilişkisi	11
Şekil 3: Bağırsakta immün iritasyon	16
Şekil 4: CD28 ve CTLA-4'ün doğal ligandları ile etkileşimleri.....	19
Şekil 5: İnsan <i>CTLA-4</i> gen yapısı ve bilinen polimorfizmleri	19
Şekil 6: <i>Foxp3</i> gen lokusu, transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici unsurlar	21
Şekil 7: <i>CTLA-4</i> ve <i>Foxp3</i> polimorfizmi çalışma akış şeması.....	25
Şekil 8: BbvI enzimi ile kesilmiş <i>CTLA-4</i> geni örnek jel görüntüsü rs:231775	28
Şekil 9: PstI enzimi ile kesilmiş <i>Foxp3</i> geni örnek jel görüntüsü rs:3761548.....	29
Şekil 10: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet frekansları	30
Şekil 11: Hastaların Marsh evreleri.....	31
Şekil 12: Çölyak hastalarında bulunan diğer hastalıklar	31

Tablolar Dizini

Tablo 1: ÇH ile ilgili aday gen bölgeleri.....	7
Tablo 2: ÇH'de Marsh-Oberhuber histolojik sınıflandırması	8
Tablo 3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar	24
Tablo 4: Amplifikasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları	25
Tablo 5: <i>CTLA-4</i> geni primer dizaynı	26
Tablo 6: Amplifikasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları	26
Tablo 7: <i>Foxp3</i> geni primer dizaynı.....	27
Tablo 8: Amplifikasyon protokolü.....	27
Tablo 9: Kesim reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları	28
Tablo 10: Kesim reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları	29
Tablo 11: Hasta ve kontrol grubunun <i>CTLA-4</i> polimorfizm sonuçlarının karşılaştırılması.....	32
Tablo 12: Hasta ve kontrol gruplarının <i>CTLA-4</i> A ve G allel frekansı.....	32
Tablo 13: Hasta ve kontrol grubunda risk allelinin varlığı ve yokluğunun dağılımı...32	
Tablo 14: Hasta ve kontrol grubunun <i>Foxp3</i> polimorfizm sonuçlarının karşılaştırılması.....	33
Tablo 15: Hasta ve kontrol gruplarının <i>Foxp3</i> A ve C allel frekansı.....	33
Tablo 16: Hasta ve kontrol grubunda risk allelinin varlığı ve yokluğunun dağılımı...33	
Tablo 17: Sadece ÇH ve diğer hastalığı olanların <i>CTLA-4</i> genotip ve allel frekansı 34	
Tablo 18: Sadece ÇH ve diğer hastalığı olanların <i>Foxp3</i> genotip ve allel frekansı	35
Tablo 19: Marsh evrelerine göre <i>CTLA-4</i> genotip ve allel frekansı.....	35
Tablo 20: Marsh evrelerine göre <i>Foxp3</i> genotip ve allel frekansı	36
Tablo 21: Hasta ve kontrol grubunda <i>CTLA-4</i> ile <i>DQB1</i> ve <i>DQA1</i> genotip frekanslarının karşılaştırılması.....	37
Tablo 22: Hasta ve kontrol grubunda <i>CTLA-4</i> ve <i>DQB1</i> *02 allel frekansları.....	37
Tablo 23: Hasta ve kontrol grubunda <i>Foxp3</i> ile <i>DQB1</i> ve <i>DQA1</i> genotip frekanslarının karşılaştırılması.....	37
Tablo 24: Hasta ve kontrol grubunda <i>Foxp3</i> ve <i>DQB1</i> *02 allel frekansları.....	38

1. GİRİŞ

Genetik yatkınlığı olan kişilerde gluten alımıyla tetiklenen Çölyak hastalığı (ÇH), 1888 yılında Samuel Jones Gee tarafından tanımlanmıştır. ÇH; yaş, cinsiyet, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı, multifaktöriyel ve multisistemik otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın en karakteristik özelliği bağırsakta mukozal lezyonlar, yani villus atrofi ve kript hiperplazisidir.

Genetik faktörler arasında, hastalığın kalıtsal olmasına esas katkı, İnsan Lökosit Antijenleri (*Human Leukocyte Antigen-HLA*) dir. *HLA* dışındaki genetik faktörlerinde ÇH riskini etkilediği bilinmektedir. *HLA* ile ilişkili olmayan (*non-HLA*) genlerden *Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4 (CTLA-4)* ve *Forkhead box p3 (Foxp3)*, immün sistemde oldukça önemli görevlere sahiptirler. *CTLA-4*, periferik toleransta ve T hücre aktivasyonunun engellenmesinde rol alır. Otoimmün hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynayan T hücre aktivasyonunun negatif düzenleyicisidir. Kusurlu *CTLA-4* ekspresyonunun ve fonksiyonunun otoimmün hastalıklarla ilişkili olması oldukça muhtemeldir. *CTLA-4* oldukça polimorfik bir gen bölgesidir ve 100'den fazla tek nükleotid polimorfizmi (*single nucleotide polymorphism*, SNP) tespit edilmiştir. *Foxp3* geni, T hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu için gerekli olan bir transkripsiyon faktörünü eksprese eder. *Foxp3*, T hücrelerinde sitokin üretimini azaltmak için bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev görür. *Foxp3* geni kromozomal konumu ve fonksiyonel rolüne dayalı olarak otoimmün hastalıklar için aday bir gendir.

Tez çalışmamızda İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları kliniğinde kesin ÇH tanısı almış ve *HLA* sınıf II tiplleme için Doku Tiplleme Laboratuvarına başvuran çölyak hastalarının periferik kanından DNA elde edilmiştir.

Çalışmamızda hastaların *CTLA-4* genindeki +49 A/G ve *Foxp3* genindeki -3279 C/A tek nükleotid polimorfizmlerinin saptanması ve hastalık ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Çölyak Hastalığı

2.1.1. Tarihçe

ÇH, genetik yatkınlığı olan kişilerde gluten alımıyla tetiklenen spesifik bir serolojik ve histolojik profil ile karakterize edilen bir otoimmün durumdur (1). İlk olarak 10.000 yıl önce Mezopotamya’da ve yaklaşık 3000 yıl sonra Avrupa’da göçebe yaşam tarzından tarımsal yerleşim yerlerine geçiş sırasında tarım devrimi ile birlikte tahılların insan diyetine girmesi sonucu ÇH ortaya çıkmıştır (1–3). Milattan sonra 2. yüzyılda Kapadokya’lı Aretaeus beslenmeyle ilişkili olduğu anlaşılan bir ‘‘abdominal’’ (koiliakos) hastalığı tanımladı. 1888’de Samuel Jones Gee şimdi ÇH olarak bildiğimiz hastalığın ilk tanımlayıcısı olarak kabul edilir. 1930’ların başlarında pediatrist K. W. Dicke ÇH’yi buğday tüketimine bağlayan ilk kişidir. İkinci Dünya Savaşı’nın sonlarına doğru devam eden tahıl kıtlığı sırasında hastalarının semptomları düzeldiğinde hipotezinin doğrulanmasına tanık oldu. 1950’lerin başlarında Dicke, Weyers ve van de Kamer, gluteni (buğday depo proteinleri) ÇH’nin hızlandırıcı faktörü olarak tanımladılar. Paulley (1954) ve Shiner (1956) hastalığın morfolojisini detaylı olarak çalıştı. Berger 1958’de anti-gliadin antikorlarını, Chorzelski 1983’te anti-endomisyum antikorlarını keşfetti (3). 1997 yılında Dietrich doku transglutaminaz enziminin ÇH’nin otoantijeni olduğunu keşfetti (4).

2.1.2. Epidemiyoloji

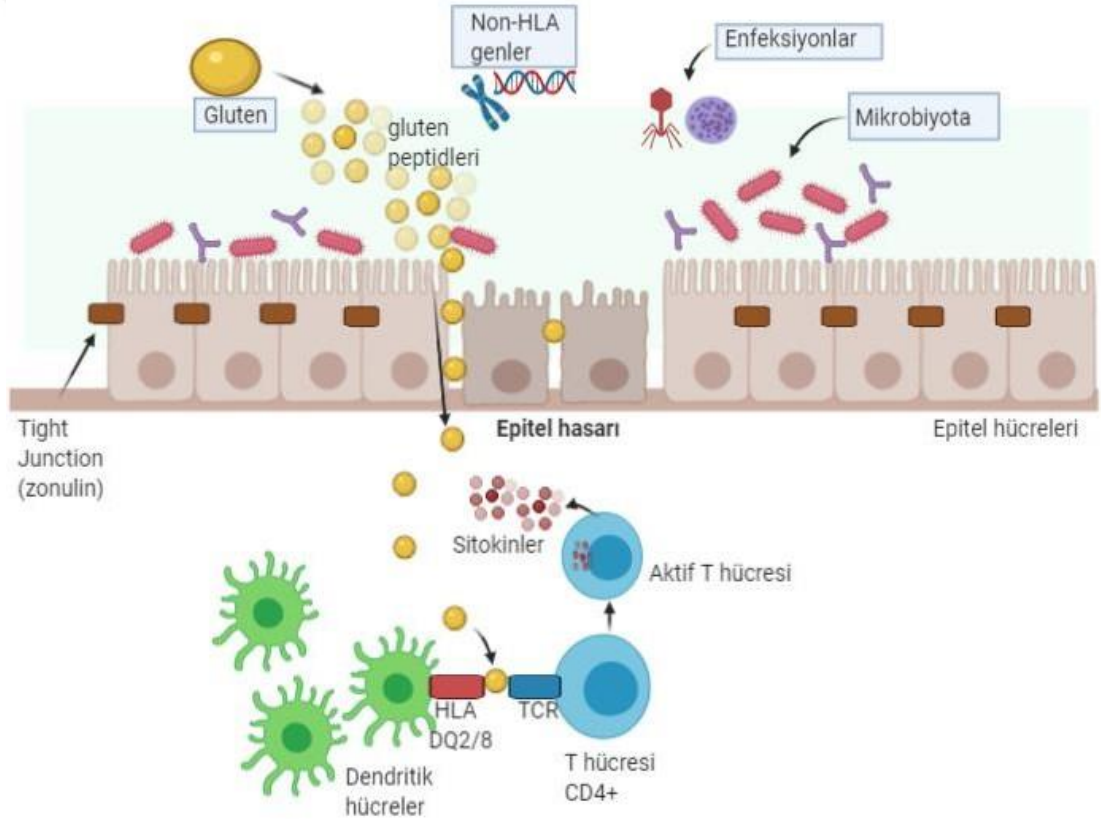
ÇH, nüfusun yaklaşık %1’ini etkiler (5). Çocuklarda görülme sıklığı %0.3-2.9’dur (6). Dünya genelinde bilinen genetik ve çevresel risk faktörleri tarafından açıklanamayan prevalans farklılıkları vardır. Örneğin, Avrupa’daki Almanya’da ÇH prevalansı diğer ülkelere göre daha düşüktür, en yüksek prevalans İsveç ve Finlandiya’dadır (5). 1975-2000 yılları arasında, şu anda bilinmeyen nedenlerle ÇH prevalansının ABD’de 5 kat arttığı gösterilmiştir (1). Türkiye’deki prevalansının ise %1.30 olduğu belirtilmiştir (7). Hastalık kadınlarda erkeklerden daha sık görülür. Ayrıca monozigot ikizlerde ve birinci derece akrabalar arasında da sıklığı on kat daha yüksektir (8).

2.1.3. Mortalite

ÇH'de mortalite oranı glutenli-glutensiz diyet, hastalığın erken teşhisi ve ince bağırsak boyunca lezyonların yaygınlığı ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada mortalite oranının değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (9). İsveç'te çölyak hastası olan 49.829 kişi ile yapılan ve 12,5 yıl süren bir kohort çalışmasında, çölyak hastalarının mortalite oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 kişi/yıl başına 9,7'ye karşı 8,6 olarak bulunmuştur (10).

2.1.4. Patogenez

ÇH patogenezinde; yaş, cinsiyet, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı, multifaktöriyel ve multisistemik otoimmün bir hastalıktır (Şekil 1).



Şekil 1. ÇH patogenezindeki mekanizmalar. (biorender.com ile çizilmiştir.)

2.1.4.1. Yaş ve Cinsiyet

2010 yılında yayınlanmış bir çalışmaya göre Türkiye'de 6-17 yaş (n=20,190 çocuk) okul çocuklarında ÇH sıklığı 1/212 olarak bulunmuştur (11). Yine Türkiye'de

2008 yılındaki bir çalışmada 1-18 yaş arasındaki 1000 çocukta hastalığın görülme sıklığı %0.9 olduğu bulunmuştur. Ayrıca kadın popülasyonunda ÇH'nin daha yaygın olduğu belirtilmiştir (12). Çalışmalar ÇH sıklığının yaşla birlikte arttığını desteklemektedir (13). Gerek adölesanlarda gerekse 65 yaş üstü erişkinlerde yeni tanı alma oranı artmıştır (14).

2.1.4.2. Gluten

ÇH'nin gelişiminden sorumlu olan başlıca çevresel faktör glutendir. Gluten (Latince "tutkal" anlamına gelir) buğday, çavdar ve arpanın prolamin depolama proteinleri için kullanılan terimdir (5). Buğday endosperminin (yaklaşık %85'ini oluşturan) ana protein bileşeni olan gluten, iki tür proteinden oluşur: gliadinler ve gluteninler (15). Gliadin ve glutenin proteinleri, suda çözünmeyen ancak alkolde çözünebilen ve çok miktarda glutamin (%38) ve prolin (%20) rezidüleri ile karakterize edilen prolaminler olarak adlandırılır (16). Gliadinler esasen monomerler olarak bulunurlar, gluteninler polimerik olanlardır. ÇH'nin patogeneğinde gliadinler, yapısındaki 33-mer peptid olarak adlandırılan molekülün genetik olarak yatkın kişilerde inflamatuvar yanıtı başlatan öncü molekül olması sebebiyle ÇH için en önemli proteinler olarak görülmeye devam etmektedir (15). Bu peptid dizisi hidrofobiktir (17) ve gastrointestinal sistemde mide, pankreas ve bağırsaklarda proteolitik sindirime karşı oldukça dirençlidir (1,18). Bunun sebebi gliadinin birçok proteazın parçalayamadığı yüksek oranda amino asit, prolin ve glutamin içermesidir. Prolince zengin bu rezidüer sıkı ve kompakt yapılar oluşturur (16).

Çölyak hastalarında gliadinin, bağırsak epitel hücrelerinin hücreler arası sıkı bağlantılarda (tight junction) geçirgenliğin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (1). Bu etki, sıkı bağlantının parçalanmasına neden olarak parasellüler geçirgenliği artıran bir molekül ailesi olan zonulin salınımı ile ilişkilendirilmiştir (19). Bu artmış geçirgenlik sayesinde, gluten submukozaya geçer. Gluten, ince bağırsağın lamina propia (LP) bölgesine transsellüler veya parasellüler yollarla girer (5). Gluten, transglutaminaz-2 enzimi (DTG-2, doku transglutaminazı olarak da bilinir) için mükemmel bir substrattır. Bu enzim, glutamin rezidülerini deamidasyon adı verilen bir süreçte negatif yüklü glutamat rezidülerine dönüştürür (20). Bu deamide peptidler doğal gluten peptidlerinden daha antijeniktir ve adaptif immün yanıtları tetikler (19).

ÇH'nin etkinliği kanıtlanmış tek tedavi şekli glutensiz diyet tedavisidir (21). Glutensiz diyete sıkı bir şekilde uyan hastalarda duodenal mukozanın tam değilse de kısmi olarak iyileştiği ve malabsorpsiyon semptomlarının giderildiği gösterilmiştir. Yetişkinlerde mukozal iyileşmenin çocuklara göre daha uzun zaman aldığı ve daha az iyileşmenin olduğu görülmüştür (22). Glutensiz beslenmenin mikrobiyotayı da etkileyebilecek bir etmen olduğu düşünülmektedir ve bağırsak atrofisinde iyileşme görüldüğü belirtilmiştir ancak mikrobiyota üzerine tek başına etkinliğini gözlemlemek kolay değildir (23). Literatürde glutensiz diyetlerin mikrobiyota üzerine etkisi çoğunlukla 4-8 hafta arasında değişen kısa süreli müdahale çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (24,25).

2.1.4.3. Enfeksiyonlar ve Mikrobiyota

Yaşamın ilk yılında veya daha sonra çocukluk çağında viral, bakteriyel veya protozoan enfeksiyonlar, ÇH patogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Enfeksiyonlar doğrudan bağırsak mukoza bariyerini veya dolaylı olarak bağırsak mikrobiyotasını ve bağışıklık sisteminin gelişmesini değiştirerek etki edebilir. Çölyak hastalarının bağırsak mikroflorasının, ÇH olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında farklı bir kompozisyona sahip olduğu birkaç çalışmada gözlenmiştir (26). Norveç'te yapılan bir kohort çalışması, influenza virüsü ile ÇH arasındaki ilişkiyi göstermiştir (27). Adenovirüs tip 12 (19), hepatit C virüsü (28) ve çocuklarda rotavirüs (29), ÇH'nin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Gastrointestinal enfeksiyonlar (30), ve yetişkinlerde kampilobakter enfeksiyonu risk faktörleri olarak bildirilmiştir (31).

Son yirmi yılda, çölyak hastalığına yatkın kişilerde bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Epitelyal bariyerin modülasyonu, gliadine özgü immün yanıtların artması ve doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonu, bağırsak mikrobiyotasının ÇH'nin gelişimini tetiklediği mekanizmalar olabildiği bildirilmiştir (19). *Shigella*, *Escherichia coli* (32), *Bifidobacteria* (33), *Staphylococcus* (34), *Clostridium* (35) ve *Lactobacillus* (36) suşlarının ÇH intestinal florasında normal popülasyondan farklı dağılımlar gösterdiği görülmüştür.

2.1.4.4. Genetik

ÇH, genetik kalıtımında birçok faktörün rol aldığı, multigenik bir hastalıktır. Genetik faktörler arasında, hastalığın kalıtsal olmasına esas katkı, *HLA*'dır (19). *HLA* kompleksi, 6. kromozomun kısa kolunda bulunur ve çok sayıda genden oluşur. *HLA* lokusları, aşırı polimorfizmleri ile dikkate değerdir, yani her lokusun birçok bilinen varyantı (alleller) vardır. ÇH'ye dâhil olan *HLA* lokusları, *DQ* lokusunda sınıf II olarak bilinen bir bölgede bulunur. *HLA-DQA1* ve *DQB1* lokusları, sırasıyla antijen sunan hücrelerin yüzeyinde heterodimerler olarak birleşen α ve β zincir proteinlerini kodlar. *HLA-DQ* molekülleri, peptid antijenlerinin $CD4^+$ T hücrelerine sunulmasından sorumludur (8). Sınıf-II *HLA* molekülleri genetik yatkınlıkta en önemli faktördür. ÇH olan kişilerin %90'ından fazlası *HLA-DQ2* haplotipine ve kalanların çoğu *HLA-DQ8* haplotipine sahiptir (5). *HLA* ilişkili moleküllerin ÇH'nin kalıtsallığına %40 katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (13).

İsveç'te 107.000 kişi ile yapılan bir çalışmanın sonucuna göre *HLA* dışındaki genetik faktörlerin ÇH riskini %68 etkilediği sonucuna varılmıştır (37). Genom-çaplı ilişki çalışmaları (GWAS) ile non-*HLA* 40'tan fazla lokusun ÇH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (38). GWAS'da dört temel gözlem yapılmıştır. İlk olarak, *HLA-DQA1* ve *HLA-DQB1* genlerini içeren *HLA* bölgesi, ÇH için en güçlü riski barındırır (39). İkinci olarak, ÇH ile ilişkili varyantların sadece %5'i protein kodlayan ekzonlarda lokalizedir, %95'i genlerin kodlama bölgelerinin dışında yer alırken, protein kodlayan gen özelliklerinin değişmesi yerine gen regülasyonundaki SNP'lerin rolünü öne sürmektedir (40). Üçüncüsü, ilişkili SNP'lerin çoğu oldukça yaygındır ve ÇH riskinde ılımlı bir artışa neden olur (41). Son olarak ilişkili hastalıklara neden olan lokusların çoğu, diğer immün aracılı hastalıklarla ortaktır ve ÇH, diğer 13 immün aracılı hastalığın her biriyle en az bir lokusu paylaşır (42).

T hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşmasında rol alan iki sitokin geni, *interlökin 2 (IL2)* ve *interlökin 21 (IL21)* ile ÇH ilişkilendirilmiştir (43). *İnterlökin 18 reseptör 1 (IL18R1)* ve *interlökin 18 reseptör yardımcı proteini (IL18RAP)*, proenflamatuar immün yanıtlar için önemli genlerdir ve çölyak hastalarında yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (43). *Miyosin IXB (MYO9B)* ve *haptoglobin 2 (HP2)*, *Par-3 Ailesi Hücre Polarite Regulatorü 3 (PARD3)* ve *Membran İlişkili Guanilat Kinaz (MAGI2)* genleri, bağırsak permeabilitesinin düzenlenmesinde yer alır

ve ÇH'nin gelişiminde yüksek risk faktörüdür (43,44). ÇH ile ilgili aday gen bölgeleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. ÇH ile ilgili aday gen bölgeleri. (45,46)

Genetik faktör	Aday genler	Hastalık patogenezindeki rolü
<i>MHC</i> genleri (<i>HLA</i>)	▪ <i>HLA</i> sınıf II: <i>DQA1*05</i> ; <i>DQB1*02</i> ; <i>DQA1*03</i> ; <i>DQB1*03</i>	▪ T hücrelerine antijen sunumu
<i>Non-HLA</i> genleri	▪ <i>IL2</i> ; <i>IL21</i> ▪ <i>IL18R1</i> ; <i>IL18RAP</i> ▪ <i>MYO9B</i> , <i>HP2</i> , <i>PARD3</i> , <i>MAGI2</i> ▪ <i>CTLA-4</i>	▪ B ve T hücre aktivasyonu ve proliferasyon ▪ Proenflamatuar sinyal yolağındaki rolü ▪ Bağırsak geçirgenliğinin düzenlenmesi ▪ T hücre yanıtında inhibitör etki

2.1.5. Histopatoloji

Çölyak'da belirgin bir histolojik anormallik gözlemlenmiştir. Hastalık öncelikle ince bağırsağın yüzey mukozasını etkiler. Daha alt katmanlar nadiren etkilenir (47). Mukozal lezyonun şiddeti ve boyutu önemli ölçüde değişir, ancak karakteristik özellikleri; villüs atrofi ile birlikte normal villüs yapısının kaybı, kript hiperplazisi ile birlikte kriptlerde belirgin genişleme, intraepitelyal lenfositlerin (IEL) yoğunluğunda artış (47) ve plazma hücrelerinin, lenfositlerin, mast hücrelerinin, eozinofillerin ve bazofillerin lamina propiaya infiltrasyonudur (48). Absorbtif epitelin birim alanı başına IEL sayısının (genellikle 100 enterosit başına IEL sayısı olarak bildirilir), villusların uçlarında arttığı gözlenmiştir (47). 100 enterosit başına en az 25 IEL ile kript hiperplazisi görülmesi infiltratif bir lezyonu düşündürür (3). Bağırsak lezyonunun derecesi, yaygın olarak kullanılan Marsh-Oberhuber sınıflandırmasına göre belirlenir. Marsh-Oberhuber sınıflandırmasının tanımlayıcı kategorileri, Tablo 2'de sunulduğu gibi altı tanı derecesini içerir.

Tablo 2. ÇH’de Marsh-Oberhuber histolojik sınıflandırması. (47)

Evre	Açıklama
0	Normal – normal villus yapısı.
I	İnfiltratif – normal mukoza ve villus yapısı; IEL sayısında artış.
II	Hiperplastik – normal villus yapısı; kript hiperplazisi.
IIIa	Kısmi villus atrofisi – hafif lenfosit infiltrasyonu, hiperplastik kriptler
IIIb	Subtotal villus atrofisi – belirgin villus atrofisi, olgunlaşmamış epitel hücrelerinde artış ile birlikte kript hiperplazisi, inflamatuvar hücre akını
IIIc	Hipoplastik – total villus atrofisi, şiddetli kript hiperplazisi, infiltratif enflamatuvar lezyon.

2.1.6. Klinik Sınıflandırma

ÇH; klasik form, non-klasik form, subklinik form, potansiyel form ve refrakter form olmak üzere 5’e ayrılır (1).

2.1.6.1. Klasik form:

Pediyatrik popülasyonda ve 3 yaşından küçük çocuklarda daha yaygın görülür (1). Malabsorpsiyon semptomları ile kendini gösterir (49). İshal, iştahsızlık, kilo kaybı, yağlı dışkı (steatore) abdominal distansiyon ve büyüme geriliği görülmektedir. Bununla birlikte, yetişkinlerde, kronik ishal, kilo kaybı ve belirgin asteni ile birlikte malabsorpsiyon sendromu oldukça nadirdir (1).

2.1.6.2. Non-klasik form:

Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde ekstraintestinal semptomlar yaygındır. Vakaların %40’ına varan oranı (demir emilim bozukluğu veya kronik inflamasyon nedeniyle) tespit edilebilen demir eksikliği mikrositik anemisini veya daha nadiren folik asit ve / veya vitamin B12 eksikliğine bağlı makrositik anemiyi içerir. Osteopeni veya osteoporoz dâhil olmak üzere kemik mineral yoğunluğundaki değişiklikler (tanı anında hastaların yaklaşık %70’ini etkiler), kalsiyum ve D3 vitamini emiliminin değişmesi ile ilgilidir. Hastalarda baş ağrısı, parestezi, nöroinflamasyon, anksiyete ve depresyon gibi çok çeşitli nörolojik semptomlar saptanabilir (1).

2.1.6.3. Subklinik form:

Subklinik form, klinik tespit eşiğinin altındadır. Subklinik terimi genellikle sessiz ÇH ve ekstraintestinal semptomları olan (ve gastrointestinal semptomları olmayan) hastaları belirtmek için kullanılmıştır. Bu tip, ayrıca klinik veya laboratuvar bulguları (demir eksikliği anemisi, karaciğer fonksiyon testlerinde anormallikler, mine kusurları, olası endoskopik özellikler, osteoporoz, vb.) olan ancak semptomları olmayan çölyak hastaları için de kullanılmıştır (49).

2.1.6.4. Potansiyel form:

Potansiyel form, normal bağırsak mukozasına sahip pozitif seroloji ve genetik belirteçler ve IEL'lerde artış gibi minimal inflamasyon belirtileriyle karakterize edilir. Potansiyel formda, klasik ve non-klasik semptomlar kendini gösterebilir veya tamamen asemptomatik olabilir (1).

2.1.6.5. Refrakter form:

Refrakter form, en az 12 aylık sıkı bir glutensiz diyetten sonra intestinal villusun atrofisi ve kalıcı semptomları ile karakterizedir. Refrakter form, ülseratif jejunoleit, kollajenöz sprue ve intestinal lenfoma gibi komplikasyonlara yol açabilir (1). ÇH'nin bu formu iki kategoriye ayrılır: normal bir IEL fenotipinin bulunduğu tip I ve anormal bir IEL popülasyonunun klonal ekspansiyonun görüldüğü tip II (50).

2.1.7. Çölyak Hastalığının Tanısı

ÇH tanısı için altın standart, duodenal biyopsi ile saptanan mukozal değişikliklerin kombinasyonu ve serolojik testlerin (anti-doku transglutaminaz antikoları, anti-endomisyal antikoları (EmA) ve deamide gliadin peptid (DGP) antikoları) pozitifliği ile temsil edilir (45). Antikolar, enzim ile ilişkili immünolojik test (ELISA) yöntemiyle araştırılır. ÇH tanısı koymak için yeterli olduğu düşünülen “beşte dört kuralı” yararlı bulunmuştur; tipik belirti ve semptomlar (ishal ve malabsorbsiyon), antikor pozitifliği, HLA-DQ2 ve/veya HLA-DQ8 pozitifliği, bağırsak hasarı (villus atrofisi ve minör lezyonlar gibi) ve glutensiz diyetle yanıt. ÇH tanısında, 5 kriterden en az 4'ü karşılanırsa doğrulanır (51).

ÇH, gliadine karşı mukozal immün yanıtın düzenlenmesinin değişebileceği bir tolerans bozukluğunun sonucu meydana geldiğinden, immün tolerans mekanizmaları ve otoimmünite arasındaki hassas denge bağışıklık sisteminde oldukça önemli bir husustur.

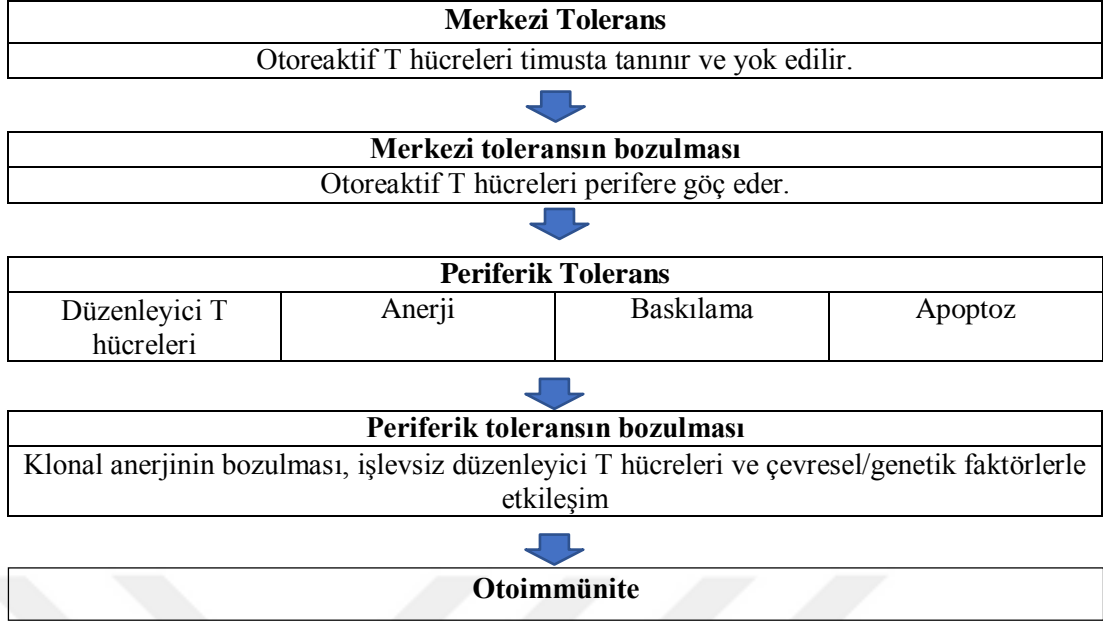
2.2. İmmün Tolerans ve Otoimmünite

İmmünolojik tolerans, bir antijene karşı, daha önce o antijene maruz kalmanın neden olduğu tepkisizlik olarak tanımlanır. Spesifik lenfositler antijenlerle karşılaştığında, aktive olarak immün yanıtlara yol açabilir, hücreler inaktifleştirilerek veya elimine edilerek toleransa yol açabilir. Bir antijen; maruz kalınan koşullara ve eşyaranlar gibi diğer eşlik eden uyaranlara bağlı olarak immün yanıtı veya toleransı indükleyebilir. Toleransı indükleyen antijenlere; onları immün yanıt oluşturan immünojenlerden ayırmak için tolerojenler veya tolerojenik antijenler denir. Self tolerans olarak da adlandırılan kendi (otolog) antijenlerine tolerans, normal bağışıklık sisteminin temel bir özelliğidir ve self toleransın başarısızlığı, otolog antijenlere karşı immün reaksiyonlara neden olur. Bu tür reaksiyonlara otoimmünite, neden oldukları hastalıklara otoimmün hastalıklar denir (52) ve insan otoimmün hastalıkları, nüfusun yaklaşık %10'unu etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (53).

Bağışıklık sistemi sürekli olarak insan vücudundaki yabancı moleküller ile savaşmak için çalışır. Self tolerans ve otoimmünite süreci arasında hassas bir denge vardır. Denge, self toleranstan uzaklaştırıldığında, otoimmünite gelişir ve bu, Şekil 2'de gösterildiği gibi otoimmün hastalıklara yol açabilir (54). Merkezi ve periferik olmak üzere iki immünolojik tolerans mekanizması vardır;

2.2.1. Merkezi tolerans

Merkezi lenfoid organlarda (timusta T hücreleri ve kemik iliğinde B hücreleri); lenfositlerin gelişimi ve olgunlaşması sırasında, kendiliğinden tepkimeye giren (self-reaktif) lenfositler, merkezi tolerans mekanizmaları tarafından yok edilir. Olgunlaşmamış T hücreleri kemik iliğinden timusa göç ettiğinde, majör histoyuymulluk kompleksi (major histocompatibility complex, MHC) moleküllerine bağlı endojen proteinlerden türetilen peptidler sunulur. Başlangıçta çift-pozitif lenfositlere ($CD4^+ CD8^+$ lenfositler), kortikal epitel hücrelerinde bulunan sınıf I veya II MHC



Şekil 2. Self tolerans ve otoimmünite arasındaki denge ilişkisi. (54)

moleküllerine bağlı self peptidler sunulur. Orta afinite ile bağlanan lenfositler, bir yaşama (survival) sinyali alır ve olgun tek-pozitif lenfositlere farklılaşır. Buna, lenfositlerin CD4⁺ veya CD8⁺ hücre soylarına bağlanmasından sorumlu olan pozitif seleksiyon denir. Bu lenfositler daha sonra timusun kortikomedüller birleşimine göç ederler ve burada kemik iliğinden türetilmiş makrofajlar ve dendritik hücreler üzerinde bulunan MHC-self peptid kompleksi ile etkileşime girerler. Bu aşamada, MHC-self peptid kompleksine yüksek afinite ile bağlanan lenfositler, negatif seleksiyona uğrar ve apoptoz ile ölür. Bu şekilde otoreaktif T hücreleri vücuttan elimine edilir. Bu süreçte medüller timik epitel hücreleri (mTEC)'nin önemi büyüktür. mTEC'ler vücutta farklı dokulara özgü genleri ifade eder ve doku-kısıtlı antijenleri (tissue-restricted antigens, TRAs) geliştirmekte olan T hücrelerine sunar ve bu TRA'lara güçlü bir şekilde bağlanan T hücrelerinin negatif seçimine neden olur. mTEC'lerin bir başka işlevi de, çevre dokulara göç eden ve merkezi toleranstan kaçmış olabilecek otoreaktif T hücrelerinin baskılanmasına yardımcı olan düzenleyici T hücrelerine (Treg) yönlendirmeleridir. (54).

2.2.2. Periferik Tolerans

İmmün tolerans farklı self antijenlerle, organlarda daha lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi olgun lenfositlerin periferik organlarda self antijenlerle karşılaşmasının sonucu da oluşabilmektedir. Merkezi toleranstan kaçan otoreaktif T

hücreleri perifere girer. Periferde otoimmüniteyi önlemek için çeşitli mekanizmalar vardır: Anerji (fonksiyonel yanıtızsızlık), Baskılama ve delesyon (apoptoz).

2.2.2.1. Anerji

T hücre yanıtları; hücreler profesyonel bir antijen sunan hücre (ASH) tarafından sunulan bir antijeni tanıdığında ve T hücreleri üzerindeki aktive edici reseptörler (CD28 gibi) ASH'ler üzerindeki eşuyaranları (B7 gibi) tanıdığında indüklenir. Eğer T hücresi eşuyaran olmadan bir self antijeni tanırsa anerji oluşur self antijene karşı yanıtızsız kalır (52).

2.2.2.2. Baskılama

CTLA-4 ve programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) otoreaktif T hücrelerinin baskılanmasını sağlayan inhibitör reseptörleridir. Treg'ler üzerindeki CTLA-4, ASH'ler üzerindeki B7 moleküllerine bağlanır veya bu molekülleri ASH'lerin yüzeyinden kaldırarak B7 eşuyaranlarını CD28 için kullanılamaz hale getirir ve T hücresi aktivasyonunu bloke eder.

2.2.2.3. Delesyon (Apoptoz)

Kendi antijenlerini tanıyan otoreaktif T hücreleri, aktivasyon yerine apoptoza uğrar; bu işleme delesyon denir. Bu işlem için önerilen bir mekanizma Fas-Fas ligand sistemidir. Fas reseptörünün Fas ligandı (FasL) ile etkileşimi, Fas pozitif hücrelerde apoptoza teşvik eder (54).

2.2.3. Düzenleyici T hücreleri

T lenfositler, antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla farklı antijen reseptör repertuvarları oluşturarak yabancı patojenlerle savaşmada temel bir role sahiptir. Ancak bu çeşitlilik, kendi antijeni tanıyan ve otoimmüniteye neden olabilecek T hücresi popülasyonlarının oluşmasına yol açabilir (55). Sakaguchi, Treg'ler olarak adlandırılan CD4⁺ CD25⁺ T hücre alt gruplarının immünsupresif fonksiyona sahip olduğunu doğrulamıştır. Treg'ler, vücudun otolog bileşenlere karşı immün toleransını kolaylaştıran ve immün homeostazını sürdüren hücrelerdir (56). Treg hücrelerinin sayısının ve işlevinin azalması, tolerans mekanizmalarında kusurlara neden olur. Sonuçta kendi antijenlerine karşı anormal immün yanıtlara yol açar ve bu

da otoimmün hastalıklara neden olur. İnsanlarda Treg'ler, yüksek düzeyde interlekin-2 (IL-2) reseptör α (CD25) ifade ederler. Ayrıca Treg'ler, gelişimlerini, işlevlerini ve stabilitelelerini sağlayan transkripsiyon faktörü Foxp3'ü eksprese etmeleri ile karakterize edilirler (57).

Treg'ler meydana geldikleri dokulara göre doğal/timik (nTreg veya tTreg) Treg'ler ve indüklenmiş/periferik (iTreg veya pTreg) Treg'ler olarak iki ana guruba ayrılır (58). iTreg ve nTreg'lerin gen ekspresyon profili önemli ölçüde farklıdır. nTreg'ler timusta ortaya çıkar ve timus mikroçevresi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. T hücre reseptörü (T cell receptor, TCR) ve dendritik hücrelerden gelen CD28 eşuayan sinyaller tarafından güçlü bir şekilde uyarılırlar. iTreg'ler, periferik lenfoid dokularda veya dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve IL-2 varlığında aktive edildiğinde *in vitro* olarak naif CD4⁺ hücrelerinden türetilir. nTreg'ler ve iTreg'ler, CD25 ve CD4'e ek olarak Foxp3 ifadesiyle de ayırt edilirken, iTreg'deki Foxp3 ifadesinin stabilitesi nTreg'lerde görülenden önemli ölçüde daha azdır. Transkripsiyon faktörünün ekspresyon seviyesinin, esasen Treg'lerin fonksiyonuna bağlı olduğu düşünüldüğünden, nTreg'lerin, immün homeostazın sürdürülmesinden sorumlu olan daha stabil bir Treg alt sınıfını temsil ettiği yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (56). Treg'lerin bir başka önemli alt tipi Tip I düzenleyici T hücreleridir (Tr1). Bu hücreler, IL-10 üretimi ve İntegrin alfa-2 (veya CD49b olarak bilinir) ve Lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG-3) ekspresyonu ile karakterize edilirler. Tr1 hücreleri, IL-10 ve TGF- β 'nin salgılanması yoluyla ASH yanıtlarının yanı sıra T hücre yanıtlarını da baskılar. Tr1 hücreleri, CTLA-4 ve PD-1 yoluyla T hücre yanıtlarını inhibe eder ve CD39 ve CD73 ektoenzimlerinin üretimi yoluyla efektör T hücrelerinin metabolik durumunu bozar. Ayrıca bu hücreler granzim B ve perforin salgırlar ve miyeloid hücreleri öldürürler. Bu nedenle, Tr1 hücrelerinin bulaşıcı hastalıkların, otoimmünitenin ve transplant reddinin altında yatan patogeneizde bir rolü olabileceği düşünülmektedir (54).

Treg'ler, baskılayıcı aktivitelerini çeşitli hücreler ve hümorale mekanizmalar ile yürütürler. Treg'lerin immün yanıtları baskıladığı dört ana süreç vardır: (1) Dendritik hücrelerin (DH) işlevlerinin ya da olgunlaşmalarının düzenlenmesi, (2) İnhibitör sitokinlerin salınımı, (3) Sitoliz ve (4) Metabolik bozulma (59).

- (1) *CTLA-4*'ü içeren spesifik yolakların araştırılması sonucu, Treg'lerin DH'leri modüle ederek efektör T hücrelerinin aktivasyonunu engelleyebileceğini göstermiştir. Çok sayıda çalışma, Treg'lerin, ASH'ler yoluyla efektör T hücrelerinin aktivasyonunu bozmak için DH'ler üzerindeki B7 eşuyan molekülleri CD80 ve CD86'yı *CTLA-4*'e bağımlı bir şekilde aşağı yönde regüle edebileceği bulgusunu desteklemiştir. *CTLA-4*, naif T hücrelerini CD28 aracılı eşuyarmadan mahrum bırakmak için yüksek afiniteye sahip CD80/CD86 ligandları ile etkileşime girer. Çalışmalar, CD80/86'nın esas olarak ASH'ler tarafından ifade edilmesine rağmen, naif T hücrelerinin de bu molekülleri ifade ederek *CTLA-4* için başka bir hedef sağladığını göstermektedir. Treg'lerin ifade ettiği LAG-3, MHC-II moleküllerine bağlanarak DH olgunlaşmasını baskılar.
- (2) TGF- β , IL-10 ve IL-35, Treg'ler tarafından salınan ana düzenleyici sitokinler olarak kabul edilir. Bu sitokinler, efektör T hücre sinyallerinin doğrudan bastırılması, interferon gamanın (IFN- γ) düzenlenmesi, Treg'lerin indüklenmesi ve Foxp3 ekspresyonunun sürdürülmesi gibi görevlerde yer alır.
- (3) Treg'ler, programlanmış hücre ölümünü indükleyen granzimlerin ekspresyonu yoluyla baskılayıcı görevini yerine getirebilir. Bu mekanizma sayesinde Treg'ler, B hücrelerini baskılayabilir, öldürebilir ve muhtemelen efektör T hücrelerinin işlevini apoptoz yoluyla engelleyebilir.
- (4) Metabolik bozulma, başka bir güçlü baskılama mekanizmasıdır. Bir dizi çalışma, Treg'lerin, efektör T hücrelerinin IL-2'ye erişimlerini engelleyerek yüksek CD25 ekspresyonu yoluyla efektör T hücrelerinin apoptozunu indükleyebildiğini göstermiştir (59).

2.2.4. İnflamatuar sitokinler

Otoimmün hastalıkları olan kişilerde mikro çevre çok karmaşıktır; IL-6, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), IL-21 ve IFN- γ gibi bir dizi proinflammatuar sitokini içerir. Bu proinflammatuar sitokinler Treg'lerin plastizitesini sağlamada kritik öneme sahip olduklarından, Treg'lerin baskılayıcı fonksiyonunu düzenleyebilirler. *In vitro* ortamda IL-6 ilave edildiğinde, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg'lerin oranında ve baskılayıcı işlevlerinde önemli bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. CD4⁺ T hücrelerinin ürettiği IL-21'in otoimmün hastalıkta inflammatuar yanıtı artırdığı ve yapılan bir

çalışmada Treg'lerin baskılayıcı işlevini bozduğu gösterilmiştir. TNF- α 'nın Treg hücrelerinin baskılayıcı işlevlerini düzenlediği, ayrıca, Treg'lerin esas transkripsiyon faktörü olan Foxp3'ü de modüle ederek işlevlerine etki ettiği gösterilmiştir (60).

2.2.5. Çölyak Hastalığının İmmünolojik Mekanizması

ÇH, gliadine karşı mukozal immün yanıtın düzenlenmesinin değişebileceği bir tolerans bozukluğunun sonucu olarak görülebilir (Şekil 3) (61). ÇH oluşum mekanizması 4 maddede özetlenebilir:

1. Bağırsak epitelinde değişiklik; Doğal bağışıklık sistemi yoluyla glutenin varsayılan toksik etkisi, sıkı bağlantı (tight junction) komplekslerinin parçalanmasına neden olabilir ve bağırsak geçirgenliğini artırabilir. Bu da gliadinin epitelden geçişini kolaylaştırabilir.
2. Lamina propiadaki gluten peptidlerinin DTG-2 enzimi tarafından deamidasyonu ve ardından spesifik HLA-DQ molekülleri bağlamında peptidlerin ASH'ler (örneğin makrofajlar, lenfositler veya DH'ler)(62) yoluyla CD4 T hücrelerine sunulması (46).
3. Antikor üretimi ve sitokin salımı ile birlikte anormal humoral ve hücre-aracılı immün yanıt. Bu sitokinler, süregelen yanıtı devam ettirebilir ve bağırsak geçirgenliğini artırabilir.
4. Lamina propia'daki CD4 T hücrelerinin oluşturduğu enflamatuvar ortamın bir sonucu olarak epitelde IEL'lerin infiltrasyonu. IEL'ler, enterositlerin yok edilmesinden sorumludur ve villus atrofisine yol açar (46).

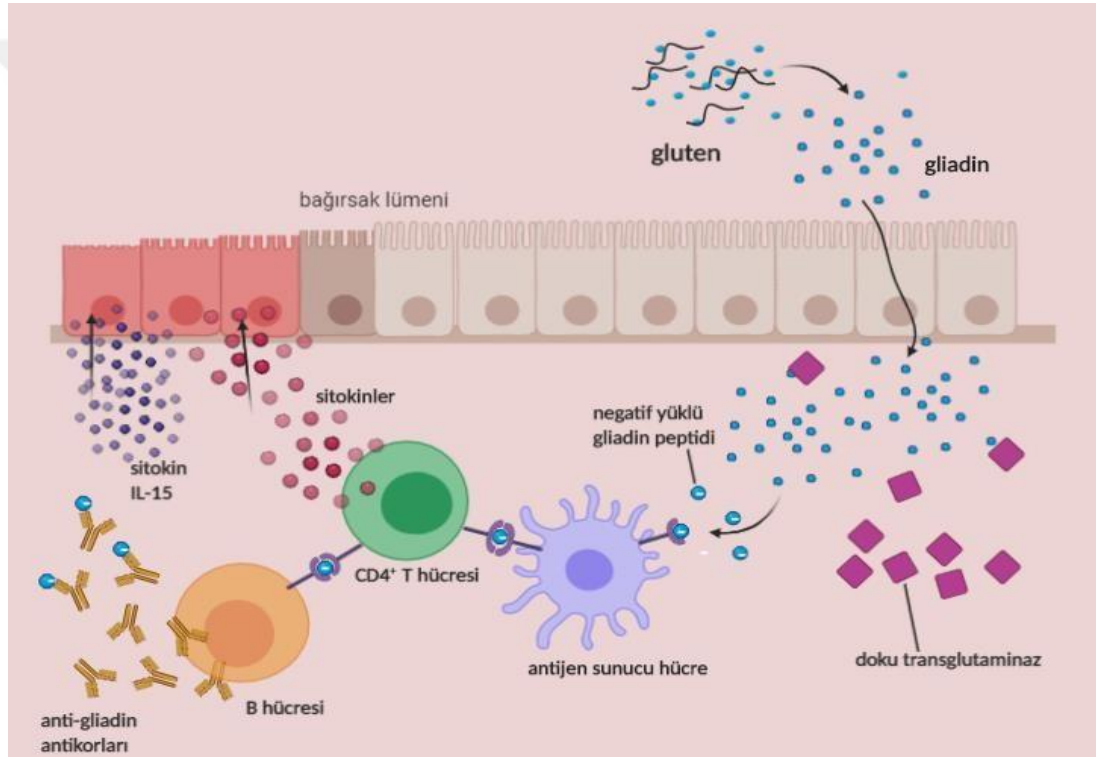
Çölyak bağırsak mukozasında bulunan Treg hücreleri (Tr1 ve Foxp3⁺ Treg'ler) IL-10 ve TGF- β antiinflamatuvar sitokinlerini salgılar. Böylece bu hücreler gluten tehdidine verilen patojenik yanıtı bastırmaya yardımcı olur (54).

ÇH mukozasında yüksek düzeyde eksprese edilen IL-15, immün regülasyona müdahale ederek TGF- β 1 aktivitesini etkiler ve bağırsak homeostazının bozulmasına neden olur (61).

Bir çalışmada, Çölyak hastalarının bağırsaklarında, hastalığın ilerlemesinde yardımcı T tip-17 (Th17) hücrelerinin rol oynadığını gösteren yüksek IL-17 seviyeleri

bulunmuştur (54). ÇH'de hem proenflamatuar hem de antiinflamatuvar sitokinleri salgılayan Th17 hücrelerinin fonksiyonel plastizite gösterdiği düşünülmektedir (63).

ÇH'de rolü olan bir başka hücre tipi de yardımcı T tip-1 (Th1)'lerdir. ÇH immünesinde Th1 hücreleri büyük miktarlarda IFN- γ üretirler. Matris metaloproteinazlar (MMP), fizyolojik ve patolojik koşullarda dokuların yeniden oluşturulmasında önemli rolü olan bir endopeptidazlar ailesidir. ÇH'de MMP ekspresyon seviyeleri artmıştır. IFN- γ 'nın bazı MMP'lerin fibroblastlardan salgılanmasını ve bunun sonucunda hücre dışı matris bileşenlerinin degradasyonunu indüklediği gösterilmiştir (63).



Şekil 3. Bağırsakta immün iritasyon. (biorender.com ile çizilmiştir.)

Bu nedenle IFN- γ belirli MMP'lerin üretiminden sorumlu olabilir, böylece ÇH'nin karakteristik mukozal lezyonlarına, yani villus atrofi ve kript hiperplazisine katkıda bulunabilir (63).

2.3. Polimorfizmler

Bir genin bir allelinde ya da iki allelinde birden meydana gelen mutasyonlarla gene bağlı bozukluklar ortaya çıkar. Genomda meydana gelen bir değişikliğin

popülasyonda genel bir farklılığa sebep olması polimorfizm olarak bilinir ve bu farklılık popülasyon genelinde %1'den fazla olmalıdır. Polimorfizmler oldukça yaygındır, bazı hastalıkların tanısında ve diğer birçok alanda kullanılırlar.

Deoksiribo-nükleit asit (DNA) polimorfizmleri genlerin protein kodlayan veya kodlamayan bölgelerinde meydana gelebilirler. DNA polimorfizm çeşitleri: SNP, sınırlayıcı enzim parça uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphisms, RFLP), değişken sayıda tandem tekrarlar (minisatellitler, variable numbers of tandem repeats, VNTR) ve kısa tandem tekrarlar (mikrosatellitler; short tandem repeats, STR). Polimorfizmler tek nükleotid değişimi ya da delesyon ve insersiyon sonucu meydana gelebilir. Tek nükleotid değişimi transisyon (pürin-pürin ya da pirimidin-pirimidin değişimi) veya transversiyon (pürin-pirimidin değişimi) yoluyla gerçekleşebilir. Delesyon, DNA dizisinden nükleotidin silinmesidir. İnsersiyon ise delesyonun tersidir. SNP en sık görülen polimorfizm tipidir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 3-10 milyon arasında SNP varyantı olduğu tahmin edilmektedir. SNP'ler protein fonksiyonunu etkileyebileceği gibi nötral de olabilirler (64).

RFLP, belli restriksiyon enzimlerinin tanıdığı DNA dizisinde varyasyonların meydana gelmesiyle enzim aktivitesi sonucunda ortaya çıkacak olan DNA fragmantlarının uzunluğunun değişmesidir. Restriksiyon enzimlerinin tanıdığı DNA dizilerinin değişimine sebep olan tek nükleotid değişimleri olarak düşünülebilirler. Eğer ilgilenilen RFLP bölgesine yakın olan polimorfik restriksiyon enzimi kesim dizileri biliniyorsa polimerize zincir reaksiyonu (PCR) analiziyle RFLP sonucunda oluşacak fragmant değişikliği kolayca saptanabilir (64).

2.4. Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4

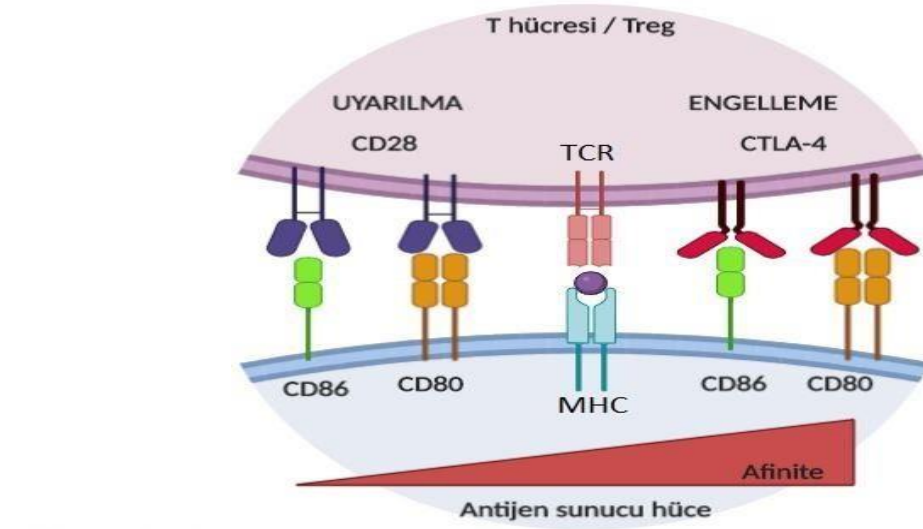
CD152 olarak da bilinen *CTLA-4*, *CD28* ve indüklenbilir T-hücre kostimulatörü (*ICOS*) ile birlikte kromozom 2'nin q33 bandında bulunur ve 223 amino asidi kodlayan dört ekzondan oluşur. *CTLA-4*'ün ekspresyonu sonucu, immünoglobulin (Ig) süper ailesine ait bir tip I transmembran protein meydana gelir (65). *CTLA-4*'ün dört domaini bulunur: ekzon 1 sinyal peptidini kodlar, ekzon 2 ekstraselüler domaini kodlar, ekzon 3 transmembran domainini kodlar ve ekzon 4 intraselüler domaini kodlar.

CTLA-4, *Foxp3*'ün hedef genidir. *Foxp3*, *CTLA-4*'ün histon asetilasyonunu düzenler. *Foxp3*'e ek olarak Treg hücrelerini kontrol eden aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT), *CTLA-4*'ü de düzenler. Bir *Foxp3* ve NFAT kompleksi, *CTLA-4*'ün promotoruna bağlanarak *CTLA-4*'ün yanı sıra IL-2 ve CD25'in ekspresyonuna yol açar.

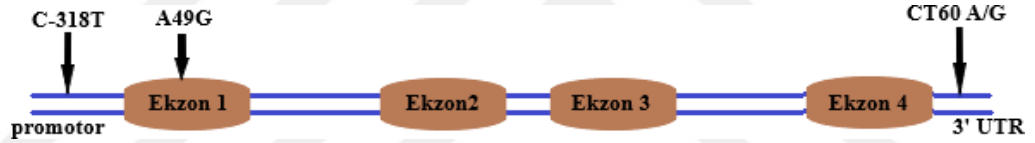
CTLA-4, hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücreleri tarafından eksprese edilebilir. Naif T hücrelerinin ve dingin (resting) efektör T hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilmezken temel olarak Treg hücreleri tarafından eksprese edilir (66). B hücreleri, dendritik hücreler, monositler, granülositler, CD3 kök hücreleri, plasenta fibroblastları ve fare embriyonik hücreleri olmak üzere diğer hücrelerin de *CTLA-4* eksprese ettiği bildirilmiştir (54).

CTLA-4, periferik toleransta ve T hücre aktivasyonunun inhibe edilmesinde rol alır. Otoimmün hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynayan T hücre aktivasyonunun negatif düzenleyicisidir. *CTLA-4*, CD28'in homologudur. CD28 bir eşyaran molekül olarak işlev görür. CD28 gibi, *CTLA-4* de ASH'ler üzerinde eksprese edilen B7 molekülleri olan CD80 (B7-1 olarak da bilinir) ve CD86 (B7-2 olarak da bilinir)'ya bağlanır. Bununla birlikte, *CTLA-4*, B7 moleküllerine CD28'den daha yüksek bir afinite ile bağlanır (Şekil 4). Afinitedeki bu farklılık göz önüne alındığında *CTLA-4*, CD80 ve CD86'ya öncelikli bağlanarak CD28'in bağlanmasını engeller. Sonuçta CD28 aracılı T hücre aktivasyonunu önler (66). Özetle, *CTLA-4*'ün B7 reseptörüne bağlanması, T hücrelerinin proliferasyonunu sınırlar ve devam eden immün yanıtı sona erdirir (67).

Kusurlu *CTLA-4* ekspresyonunun ve fonksiyonunun otoimmün hastalıklarla ilişkili olması oldukça muhtemeldir (68). *CTLA-4*'ten yoksun hayvanların, çok sayıda doku infiltrasyonu ve self-reaktif T hücrelerinin neden olduğu organ yetmezliği ile karakterize edilen ölümcül otoimmün hastalıktan öldüğü bildirilmiştir (69). *CTLA-4* oldukça polimorfik bir gen bölgesidir ve 100'den fazla SNP tespit edilmiştir (Şekil 5) (70). Bunlardan bazıları, 3'-çevrilmemiş bölgede (UTR) CT60 A/G SNP, promotor bölgede -318. pozisyonda C/T SNP ve 1. ekzonun 49. pozisyonunda bulunan ve sinyal peptid molekülünde Ala/Thr değişimine neden olan A/G SNP'dir (71).



Şekil 4. CD28 ve CTLA-4'ün doğal ligandları ile etkileşimleri. (72)



Şekil 5. İnsan *CTLA-4* gen yapısı ve bilinen polimorfizmleri. (73)

CTLA-4 polimorfizmleri; ÇH, tip I diyabet (T1DM), otoimmün tiroid hastalığı, sistemik lupus eritematöz, Grave hastalığı, romatoid artrit ve multipl skleroz dâhil olmak üzere çeşitli otoimmün bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (68). ÇH ile ilgili yapılan bir çalışmada, bir organ kültürü modeli kullanılarak, *CTLA-4* immunoglobulinin gliadine-özgü T hücrelerinin apoptozu dâhil olmak üzere birçok immünolojik özelliği kontrol ettiği gösterilmiştir (74). Bu bulgular, *CTLA-4*'ün ÇH ve diğer kronik enflamatuar hastalıklar için ilginç bir aday olduğunu göstermiştir (75).

2.5. Forkhead Box P3

Foxp3 geni X kromozomunun p kolunda bulunur. Yüksek oranda korunmuş olan bu gen 11 ekzon içerir (76). 431 amino asitten oluşan 47-kDa (kilodalton) protein olan transkripsiyon faktörü Foxp3, Fox protein ailesinin P alt ailesinin bir üyesidir (77). Yapısal olarak *Foxp3* üç ana domain içerir: transkripsiyonel aktivasyondan ve

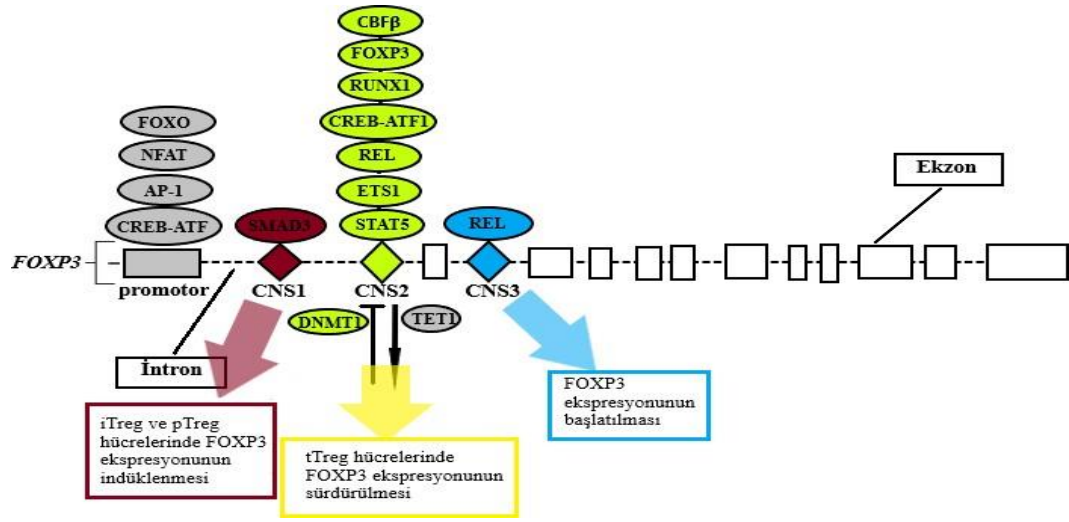
immün yanıtların baskılanmasından sorumlu prolin bakımından zengin bir N terminal domaini (1-97 aminoasit), oligomer oluşumunda veya diğer faktörlerle ilişkide rol oynayan merkezi bir çinko parmak lösün-fermuar domaini (98-260 aminoasit) ve DNA bağlanmasından sorumlu bir korunmuş C-terminal forkhead domaini (337–423 aminoasit). Bu domainler, *Foxp3* işlevini değiştirmek için birlikte çalışırlar (78).

T hücre reseptörü ve eşyaranlar yoluyla oluşturulan sinyallere yanıt olarak NFAT ve aktivatör protein 1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri *Foxp3* promotoruna bağlanır ve gen aktive edilir (76). Birçok çalışma, Forkhead boxO 1/3 (FOXO1/3) transkripsiyon faktörlerinin doğrudan *Foxp3* lokusunda promotor bölgesine bağlanarak hem tTreg hem de pTreg hücrelerinde *Foxp3* ekspresyonunu ve Treg hücre farklılaşmasını düzenlediğini göstermiştir (79).

Dizi analizleri, *Foxp3* lokusunda yüksek düzeyde korunmuş kodlamayan (*conserved non-coding sequences*, CNS) üç bölgeyi ortaya çıkarmıştır, bunların hepsinin epigenetik modifikasyonlara tabi olduğu ve *Foxp3*'ün transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur (Şekil 6) (80).

CNS3, ekzon 1 ve ekzon 2 arasında yer alır ve timustaki Treg hücre gelişiminin önemli bir düzenleyicisi olan REL transkripsiyon faktörünün bağlanması ile *Foxp3* transkripsiyonunu kontrol eden epigenetik bir anahtar olarak çok önemli bir role sahiptir (76).

CNS2 (Treg'lere özgü demetile bölge olarak da bilinir), tTreg hücrelerinde timustan ayrıldıktan sonraki *Foxp3* ekspresyonunu sürdürmek için önemlidir. CNS2 bölgesi, *Foxp3*'ün ilk intronu içinde yer alır ve CNS2 içindeki CpG elemanları, tTreg hücre gelişimi sırasında büyük ölçüde hipometillenir. CNS2'deki demetile CpG motifleri ve *Foxp3* genindeki diğer düzenleyici öğeler, REL, Siklik amp-yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB)-Aktive edici transkripsiyon faktörü 1 (ATF1), Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 1 (RUNX1)-Çekirdek bağlayıcı faktör altbirim beta (CBF β), ETS proto-onkogen 1 (ETS1), Transkripsiyon 5'in sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT5) ve *Foxp3*'ün kendisi de dâhil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlar. Bu epigenetik durumun sürdürülmesi, *Foxp3*'ün doku iltihabı dâhil çeşitli koşullar altında tTreg hücreleri tarafından stabil bir şekilde ifade edilmesine olanak sağlar. Metil-CpG bağlayıcı domain proteini 2 (MBD2), CNS2'ye



Şekil 6. *Foxp3* gen lokusu, transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici unsurlar. (76)

bağlanır ve CNS2'nin hipometilasyonunu sürdüren on-on bir translokasyon (TET) demetilazları toplar.

Farelerde MBD2 fonksiyonunun bastırılması, Treg hücrelerinin sayısının azalmasına neden olur ve geri kalan Treg hücrelerinin baskılayıcı özellikleri azalır. DNA metiltransferaz 1'in (DNMT1), CNS2'de metilasyon olaylarını desteklediği bilinmektedir. Bu enzim ve benzer faktörler, tTreg hücre aktivitesinden sorumlu olan epigenetik programlamayı etkisiz hale getirebilir. Proenflamatuar sitokin IL-6'nın Treg hücrelerinde CNS2 motiflerinin DNMT1'e bağımlı metilasyonunu tetiklediği, IL-2 veya C vitaminine maruziyetin CNS2'de hipometilasyonu sürdürmek için TET enzimlerini harekete geçirdiği gösterilmiştir. IL-6'ya maruz kalma, histon H3'ün asetilasyonunu da azaltır ve *Foxp3* transkripsiyonunu olumsuz yönde etkiler. Tersine, TGFβ sinyali, DNMT1 ekspresyonunun bastırılması yoluyla *Foxp3* ekspresyonunun epigenetik stabilizasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

CNS1, T hücrelerinde timus dışında *Foxp3* ekspresyonunun indüklenmesi için önemli bir enhansır bölgedir. CNS2'ye benzer şekilde, CNS1 intronik bölgede yer alır. CNS1, TGFβ ile indüklenen SMAD sinyaline yanıt olarak *Foxp3* ekspresyonunu etkinleştirmek için gereklidir. Aktif SMAD3'ün CNS1'e bağlanması pTreg hücrelerinin farklılaşması sırasında *Foxp3* ekspresyonunun uyarılmasında önemli bir

süreçtir (76). Yapılan bir çalışma göstermiştir ki CNS1'in delesyonu pTreg'lerin uyarılmasında kritik iken tTreg'lerde değildir (81).

Foxp3 geni Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu için gerekli olan bir transkripsiyon faktörünü eksprese eder. *Foxp3*, T hücre aktivasyonunu düzenler ve T hücrelerinde sitokin üretimini azaltmak için bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev görür. Birlikte ele alındığında *Foxp3*, kromozomal konumu ve fonksiyonel rolüne dayalı olarak otoimmün hastalıklar için aday bir genidir. *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmi ve (GT)n mikrosatellit polimorfizmi, her ikisi de promotor bölgesinde yer alır ve *Foxp3* ekspresyonunu değiştirebilir. -3279 C/A polimorfizminin AA genotipi, bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanamamasına neden olur ve *Foxp3*'ün hatalı transkripsiyonuna yol açar. (GT)n mikrosatellit polimorfizmi, değişen enhansır aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. *Foxp3*'ün hatalı ekspresyonu, Treg hücrelerinin eksikliğine ve ardından aktive edilen CD4⁺ T hücrelerine neden olur. Sonuçta otoimmün hastalıkların gelişmesine katkıda bulunması mümkündür (82).

ÇH'de *Foxp3*⁺ Treg'lerin baskılayıcı mekanizmasının belirsizliğini koruduğu bildirilmiştir. *in vitro* çalışmalar, baskılayıcı işlevin hücre temasına bağlı olarak ve sitokinden bağımsız olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte hayvan modellerini içeren çalışmalarda, *Foxp3*⁺ Treg hücreleri yoluyla immün yanıtların baskılanmasında IL-10'un rolü olduğunu bildirmiştir. Bir diğer çalışmada *Foxp3*⁺ Treg'lerin Th17 ve Th17 / Th1 hücrelerini *in vivo* IL-10'a bağımlı bir şekilde kontrol ettiğini göstermiştir (63).

Otoimmün bir hastalık olan Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (IPEX) sendromu, esas olarak Treg hücrelerinin işlevinin bozulduğu bir durumdur. Yine IPEX patogenezinde oto-reaktif Th17 hücre ekspansiyonu ve enflamatuar ortamda oto-reaktif B hücrelerinin sürekli olarak otoantikor üretmesi gibi immün fonksiyon bozukluklarına neden olan olayları içermektedir (79). Bennett ve ark. IPEX etiyojisine ilişkin *Foxp3* geninde yaklaşık 63 mutasyon bildirmiştir (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez önerisi ve etik kurul başvuruları yapıldı. Şubat 2019 tarihinde kabul alındıktan sonra, BAP proje başvurusu tamamlandı. Deneysel çalışmalar, Ekim 2020-Ocak 2021 tarihleri arasında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları'nda yapıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın evreni; Avrupa Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Topluluğu'nun (ESPGHAN) belirlediği kriterler dâhilinde İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Gastroenteroloji servisinin Çölyak tanısı koyduğu 18 yaşından küçük 125 hasta ve 18 yaşından küçük sağlıklı 100 kontrol grubundan oluşturuldu.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızdaki hasta ve sağlıklı kontrol grubu; retrospektif etik kurul onayı alınarak, daha önce etik kurul onayı alınmış 16.11.2017 tarihli 113 No.lu 2018-TYL-SABE-0055 isimli projede kullanılan izole edilmiş olan DNA'lardan oluşturuldu.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkenleri; *CTLA-4* ve *Foxp3* gen polimorfizmlerindeki değişimlerdir. Araştırmanın bağımsız değişkenleri; hastaların demografik özelliklerindeki değişimlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

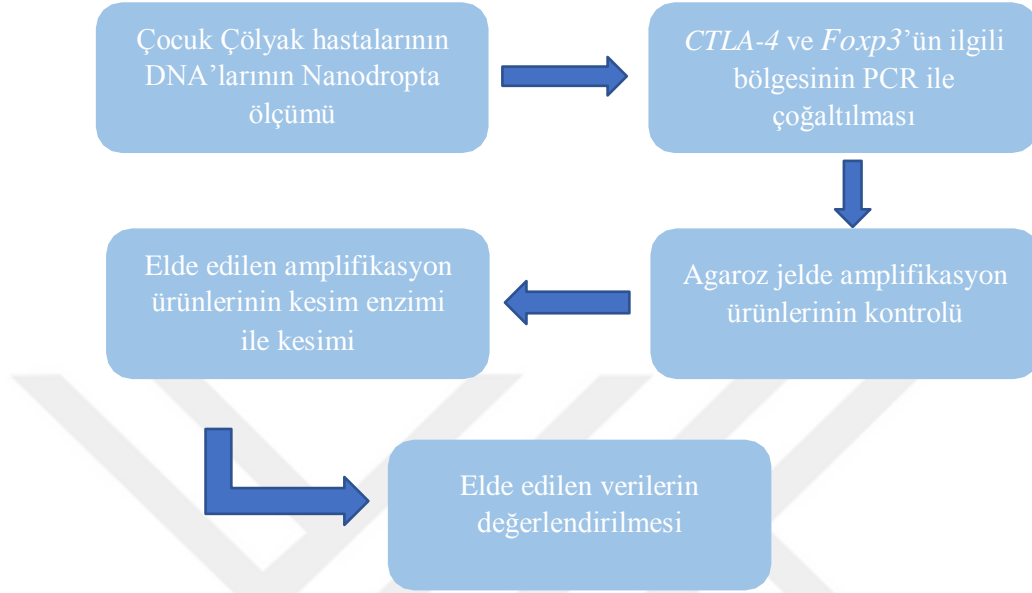
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar.

Malzeme Adı	Marka/Kod	Kullanım Amacı
Nanodrop	Thermo Nanodrop2000	DNA konsantrasyonunun ölçülmesi
Thermal Cycler	Boeco Germany TC-PRO	İlgili gen bölgelerinin çoğaltılması
Agaroz	Prona	Agaroz jel hazırlama
Elektroforez	Thermo Fisher	Amplikonların kontrol edilmesi
UV Transsimilatör	VILBER LOURMAT ECX-F20.M	Jelde yürütülen ürünlerin görüntülenmesi
Vorteks	FINEVORTEX	PCR bileşenlerinin vortekslenmesi
Hassas Terazı	Shimadzu TW423L	Agarozun tartılması
Santrifüj	WiseSpin CF-10	Hazırlanan mix'lerin karıştırılması
Mikrodalga	Samsung	Agarozun çözdürülmesi
İnkübatör	Nüve EN055	Kesim enzimlerinin aktivasyonu için uygun sıcaklığın sağlanması
DNA Size Marker	GENESTA 5x Loading Buffer	Agaroz jel yükleme boyası
Restriksiyon enzimi (PstI)	Thermo Scientific ER0611 (3000U)	PCR ürünlerinin (<i>Foxp3</i>) kesilmesi
Restriksiyon enzimi (BbvI)	Thermo Scientific ER1451 (100U)	PCR ürünlerinin (<i>CTLA-4</i>) kesilmesi
Ethidium Bromide	invitrogen	Agaroz jelde DNA fragmanlarının görüntülenmesi
TBE Buffer 10X	A.B.T.	Elektroforez tamponu
DNA Ladder 100 bp	Thermo Scientific GeneRuler	Agaroz jelde DNA merdiveni oluşturma

3.6.2. Deneysel Çalışmalar

Çölyak hastalarında *CTLA-4* ve *Foxp3* polimorfizmlerinin araştırılması amacıyla yapılan polimorfizm çalışmamızın akış şeması aşağıda Şekil 7’de verildi.



Şekil 7. *CTLA-4* ve *Foxp3* polimorfizmi çalışma akış şeması.

3.6.2.1. Nanodropta Ölçüm

Thermo Scientific 2000 Nanodrop cihazında DNA konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyonları 100-120 µl/ng olacak şekilde ayarlandı.

3.6.2.2. *CTLA-4* Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo 4. Amplifikasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları

Reaksiyon Mix*	
Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	0,5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
dNTP	0,5 µl
dH ₂ O	DNA miktarına göre
Taq polimeraz enzimi	0,25 µl
Total	25 µl

*1x'lik mix için miktarlar

3.6.2.2.1. Primer dizaynı

CTLA-4 genindeki rs231775 polimorfizmi için literatür taraması yapıldıktan sonra (84) primerler aşağıda Tablo 5’de verildiği şekilde firmaya (Oligomer, Ankara) sentezletildi;

Tablo 5. *CTLA-4* geni primer dizaynı.

<i>CTLA-4</i>	F: 5’ CCACGGCTTCCTTTCTCGTA 3’
	R: 5’AGTCTCACTCACCTTTGCAG 3’

Liyofilize halde gelen primerler ana stok 100 µM olacak şekilde F’ (forward) için 477 µl, R’ (reverse) için 583 µl ultra saf su ile (Nuclease-free) hazırlandı. Hazırlanan ana stoktan 10 µM olacak şekilde ara stok oluşturuldu. Primerler vorteks kullanmadan spin atırıldı.

DNA miktarı 1-5 µl olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda gruplara ayrılarak çalışıldı. PCR tüplerinin kapağı kapatıldıktan sonra spin atırıldı. PCR cihazında uygun sıcaklığı belirlemek için gradiyent çalışması yapıldı. Çalışılan ürünler agaroz jelde yürütülerek uygun sıcaklık belirlendi.

3.6.2.3. *Foxp3* Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo 6. Amplifikasyonda kullanılan malzemeler ve miktarları

Reaksiyon Mix*	
Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	0,2 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
dNTP	0,5 µl
dH ₂ O	DNA miktarına göre
Taq polimeraz enzimi	0,2 µl
Total	25 µl

*1x’lik mix için miktarlar

3.6.2.3.1. Primer Dizaynı

Foxp3 genindeki rs3761548 polimorfizmi için literatür taraması (85) yapıldıktan sonra primerler aşağıda Tablo 7’de verildiği şekilde firmaya (Oligomer, Ankara) sentezletildi;

Tablo 7. *Foxp3* geni primer dizaynı.

<i>Foxp3</i>	F: 5' TAACCAGACAGCGTAGAAGG 3'
	R: 5' CAATACAGAGCCCATCATCA 3'

Liyofilize halde gelen primerler ana stok 100 µM olacak şekilde F' için 690 µl, R' için 514 µl ultra saf su ile (Nuclease-free) hazırlandı. Hazırlanan ana stoktan 10 µM olacak şekilde ara stok oluşturuldu. Primerler vorteks kullanmadan spin atırıldı.

DNA miktarı 1-5 µl olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda gruplara ayrılarak çalışıldı. PCR tüplerinin kapağı kapatıldıktan sonra spin atırıldı. PCR cihazında uygun sıcaklığı belirlemek için gradiyent çalışması yapıldı. Çalışılan ürünler agaroz jelde yürütülerek uygun sıcaklık belirlendi.

Her iki gen bölgesini çoğaltmak için aynı PCR koşulunun uygun olduğu belirlendi.

Tablo 8. Amplifikasyon protokolü.

Basamak	Sıcaklık	Döngü	Süre
Başlama Denatürasyonu	94 °C	1	5 dk
Denatürasyon	94 °C	30	45 sn
Bağlanma	61 °C		45 sn
Uzama	72 °C		45 sn
Final Uzama	72 °C	1	5 dk
Bitiş	4 °C	-	∞

3.6.2.4. Agaroz Jel Elektrofrez

Her iki gen bölgesi için aynı şartlarda jel hazırlandı ve yürütüldü. PCR işlemi bittikten sonra Tris-Boric asit EDTA tampon (TBE) ile %1,5'lik agaroz hazırlandı. Jel donduktan sonra 3 µl ampikon ve 1,5 µl yükleme boyası karıştırılarak jele yüklendi.

140 V'ta 40 dakika yürütüldü. Jel elektroforezinden sonra UV'de bantların görüntüsü alındı. (Sürüntü ve silik bant oluşumu olan ampikonlar için PCR işlemi tekrar edildi.)

3.6.2.5. CTLA-4 Ampikonlarının Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

PCR işleminden sonra 10 µl ile kesim reaksiyonu kuruldu. 1 gece kesim enzimiyle birlikte 37° C'de bekletildi.

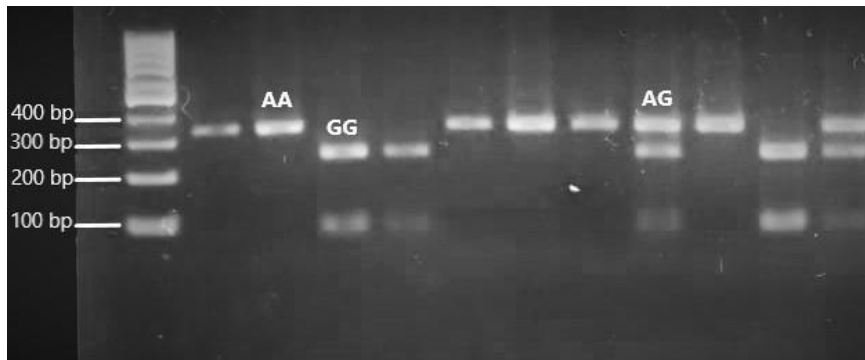
Tablo 9. Kesim reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları.

Kesim Reaksiyonu*	
Buffer	2 µl
Su	18 µl
Enzim (BbvI)	1 U

*1x'lik mix için miktarlar

3.6.2.5.1. Agaroz Jel Görüntüsünü Değerlendirme

Enzim kesimi sonunda ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV Transsimilatör'de değerlendirildi (Şekil 8). 328 bp olanlar tek bant olarak AA, 244 bp ve 84 bp olmak üzere 2 bant bulunanlar GG, 328 bp, 244 bp, 84 bp olanlar ise AG olarak isimlendirildi.



Şekil 8. BbvI enzimi ile kesilmiş CTLA-4 geni örnek jel görüntüsü rs:231775.

3.6.2.6. *Foxp3* Amplikonlarının Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

PCR işleminden sonra 10 µl ile kesim reaksiyonu kuruldu. 1 gece kesim enzimiyle birlikte 37° C’de bekletildi.

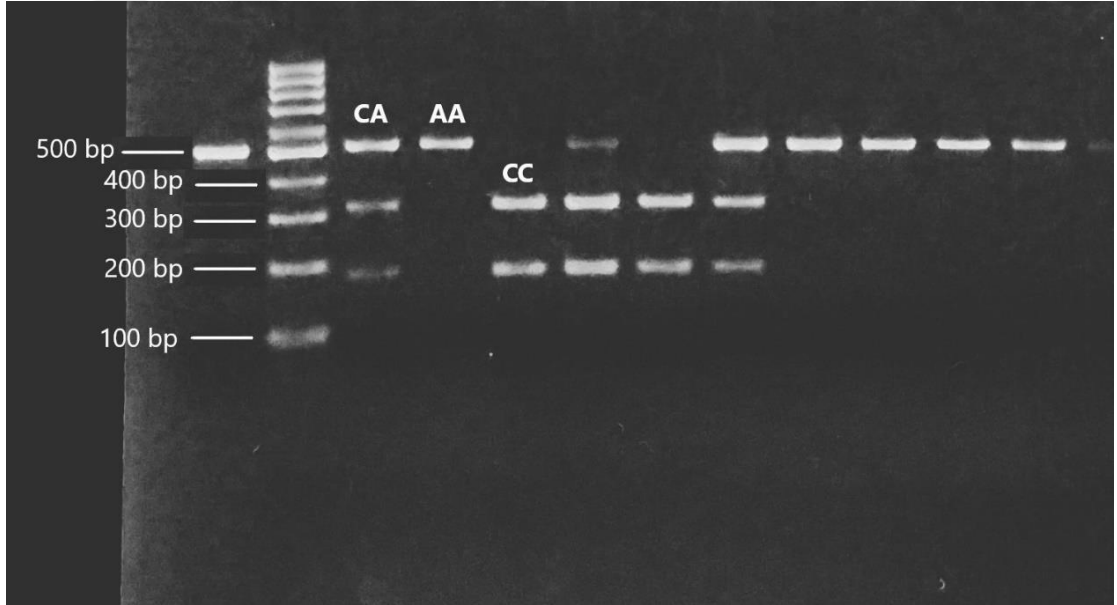
Tablo 10. Kesim reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve miktarları.

Kesim Reaksiyonu*	
Buffer	2 µl
Su	18 µl
Enzim (PstI)	1 U

*1x’lik mix için miktarlar

3.6.2.6.1. Agaroz Jel Görüntüsünü Değerlendirme

Enzim kesimi sonunda ürünler %2’lik agaroz jelde yürütülerek UV Transsimilatör’de değerlendirildi (Şekil 9). 503 bp olanlar tek bant olarak AA, 319 bp ve 184 bp olmak üzere 2 bant bulunanlar CC, 503 bp, 319 bp ve 184 bp olanlar CA olarak isimlendirildi.



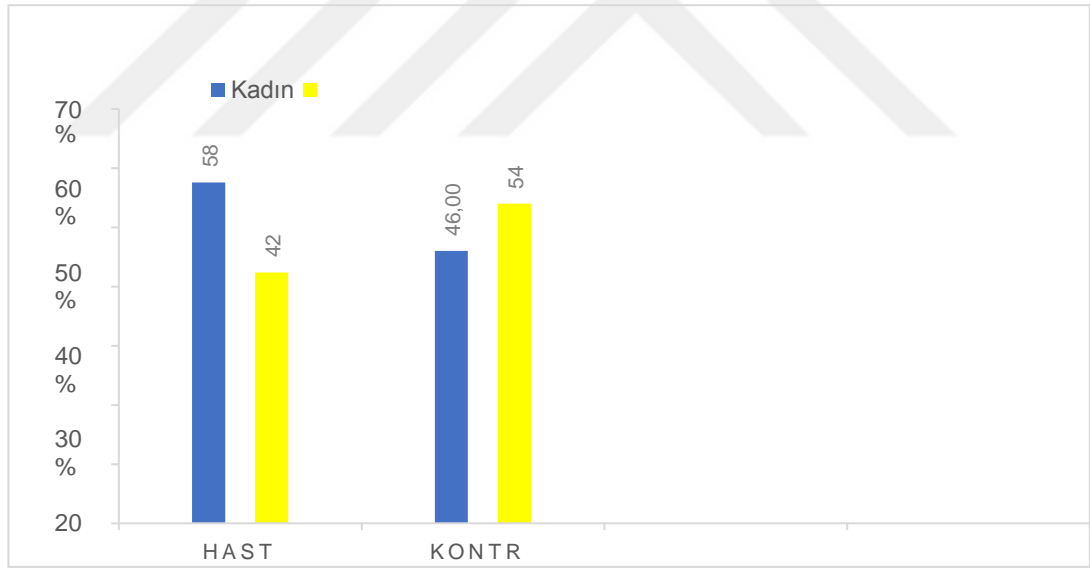
Şekil 9. PstI enzimi ile kesilmiş *Foxp3* geni örnek jel görüntüsü rs:3761548.

4. BULGULAR

Çalışmamıza; 16.11.2017 tarihli 113 No.lu 2018-TYL-SABE-0055 isimli proje kapsamındaki, T.C Sağlık Bakanlığı İzmir Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Gastroenteroloji bölümünde ÇH tanısı konulmuş ve Eylül 2017- Ocak 2018 tarihleri arasında HLA DQ tiplene testi için TEAH Doku Tiplene Laboratuvarına gönderilen 125 hasta dâhil edildi.

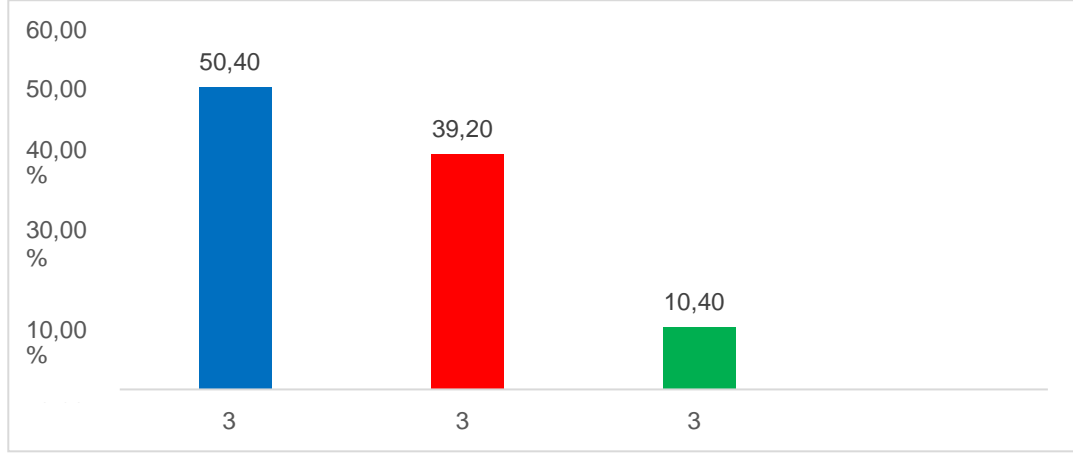
Kontrol grubu olarak 18 yaşından küçük 100 sağlıklı kemik iliği vericileri dâhil edildi.

Şekil 10'da çölyak hastalarında cinsiyet frekansına bakıldığında kadın %58 (n:72), erkek %42 (n:53), kontrol grubunda ise kadın %46 (n:46), erkek %54 (n:54) olduğu saptandı.



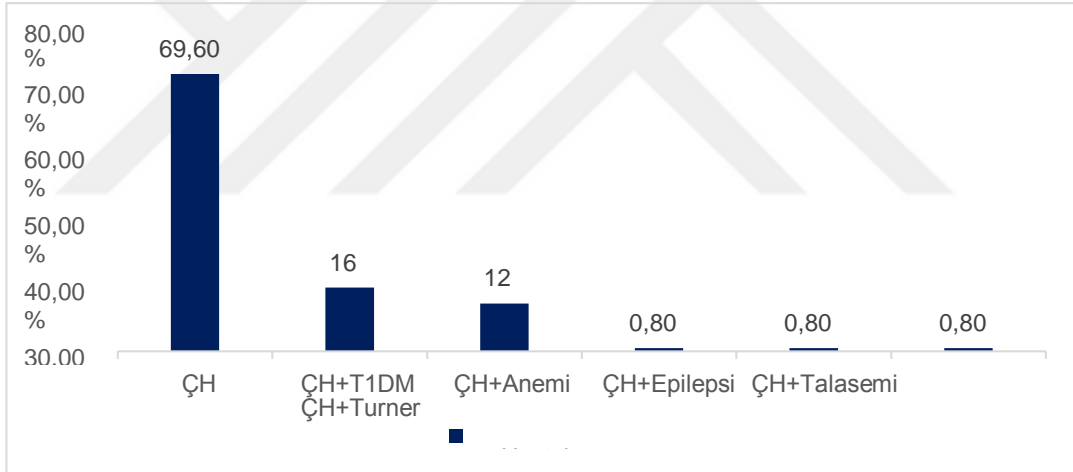
Şekil 10. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet frekansları

Şekil 11'de 125 hastanın hastalık evresi frekansına bakılarak %50,4 (n:63) tip 3A, %39,2 (n:49) tip 3B, %10,4 (n:13) tip 3C olduğu saptandı.



Şekil 11. Hastaların Marsh evreleri.

125 hastadan % 69,6 (n:87)'sı sadece çölyak hastası, % 16 (n:20)'sı T1DM, % 12 (n:15) anemi, %0,8 (n:1)'i turner sendromu, %0,8 (n:1)'i talasemi, %0,8 (n:1)'i ise epilepsi hastası idi (Şekil 12).



Şekil 12. Çölyak hastalarında bulunan diğer hastalıklar.

CTLA-4 geninde rs231775 polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması Tablo 11'de görülmektedir. Hasta grubu ile kontrol grubu AA, AG, GG genotipleri Kikare testi yapılarak karşılaştırıldığında anlamlı değildi. Ayrıca relatif risk açısından değerlendirildiğinde; hastalardaki AA ve GG grubunda RR>1 olarak bulundu.

Hasta ve kontrol grubunun *CTLA-4* A ve G allel frekansı Tablo 12'de gösterilmektedir.

Tablo 11. Hasta ve kontrol grubunun *CTLA-4* polimorfizm sonuçlarının karşılaştırılması.

	Genotip Frekansı			<i>p</i>
	AA %(<i>n</i>)	AG %(<i>n</i>)	GG %(<i>n</i>)	
Hasta	%45,6(n:57)	%40(n:50)	%14,4(n:18)	0,52
Kontrol	%42(n:42)	%47(n:47)	%11(n:11)	
Relatif Risk	1,09	0,85	1,3	

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarının *CTLA-4* A ve G allel frekansı.

	A Allel Frekansı	G Allel Frekansı	<i>p</i>
Hasta Grubu (n:125)	%36,44(n:164)	%19,11(n:86)	0,98
Kontrol Grubu (n:100)	%29,11(n:131)	%15,33(n:69)	
Relatif Risk	1,25	1,25	

Hasta grubunda A alleli %36,44 (n:164), G alleli %19,11 (n:86) dir. Kontrol grubundaki A alleli %29,11 (n:131) iken G alleli %15,33 (n:69) dur. Hasta grubunda A allel frekansının ve G allel frekansının kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu saptandı ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grubu arasında risk alleli Tablo 13’de gösterildi.

Tablo 13. Hasta ve kontrol grubunda risk allelinin dağılımı.

	AA	GG + AG	<i>p</i>
Hasta Grubu	%45,6(n:57)	%54,4 (n:68)	0,58
Kontrol Grubu	%42(n:42)	%58 (n:58)	

Foxp3 geninde rs3761548 polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması Tablo 14’de görülmektedir. Hasta grubu ile kontrol grubu AA, CA, CC genotipleri karşılaştırıldığında anlamlı değildi. Ayrıca relatif risk açısından değerlendirildiğinde; hastalardaki AA ve CA grubunda $RR>1$ olarak bulundu.

Hasta ve kontrol grubunun A ve C allel frekansı Tablo 15’de gösterilmektedir.

Tablo 14. Hasta ve kontrol grubunun *Foxp3* polimorfizm sonuçlarının karşılaştırılması.

	Genotip Frekansı			<i>p</i>
	AA %(<i>n</i>)	CA %(<i>n</i>)	CC %(<i>n</i>)	
Hasta	%31,2(n:39)	%39,2(n:49)	%29,6(n:37)	0,097
Kontrol	%28(n:28)	%29(n:29)	%43(n:43)	
Relatif Risk	1,1	1,35	0,69	

Tablo 15. Hasta ve kontrol gruplarının *Foxp3* A ve C allel frekansı.

	A Allel Frekansı	C Allel Frekansı	<i>p</i>
Hasta Grubu (n:125)	%28,22(n:127)	%27,33(n:123)	0,079
Kontrol Grubu (n:100)	%18,8(n:85)	%25,55(n:115)	
Relatif Risk	1,5	1,07	

Hasta grubunda A alleli %28,22 (n:127), C alleli %27,33 (n:123) dür. Kontrol grubundaki A alleli %18,8 (n:85) iken C alleli %25,55 (n:115) dir. Hasta grubunda A allel frekansının ve C allel frekansının kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu saptandı ($p>0,05$).

Tablo 16’da hasta ve kontrol grubu arasında risk alleli incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Tablo 16. Hasta ve kontrol grubunda risk allelinin dağılımı.

	CC	CA + AA	<i>p</i>
Hasta Grubu	%29,6 (n:37)	%70,4 (n:88)	0,03
Kontrol Grubu	%43 (n:43)	%57 (n:57)	

Sadece ÇH bulunan hastaların *CTLA-4* genotip frekanslarına bakıldığında %65,5 (n:38) AA, %71,4 (n:35) AG, %57,8 (n:11) GG dir. T1DM hasta grubunda %19 (n:11) AA, %16,3 (n:8) AG, %21 (n:4) GG dir. Anemili hastalarda ise %10,3 (n:6) AG, %12,2 (n:6) AG, %10,5 (n:2) GG dir. Diğer hastalığa sahip olanlarda %5,17 (n:3) AA ve %10,5 (n:2) GG dir.

Tablo 17’de ÇH ve sekonder hastalığı olanların *CTLA-4* genotip ve allel frekansı gösterildi.

Sadece ÇH bulunan hastaların *Foxp3* genotip frekanslarına bakıldığında %65,7 (n:25) AA, %74 (n:37) CA, %59,4 (n:22) CC dir. T1DM hasta grubunda %21 (n:8) AA, %18 (n:9) CA, %16,2 (n:6) CC dir. Anemili hastalarda ise %10,5 (n:4) AA, %6 (n:3) CA, %16,2 (n:6) CC dir. Diğer hastalığa sahip olanlarda %2,6 (n:1) AA, %2 (n:1) CA, %8 (n:3) CC dir.

Tablo 17. Sadece ÇH ve diğer hastalığı olanların *CTLA-4* genotip ve allel frekansı.

Hastalık	Genotip			Allel	
	AA %(n:)	AG %(n:)	GG %(n:)	A Allel Frekansı	G Allel Frekansı
Sadece ÇH	%65,5 (n:38)	%71,4 (n:35)	%57,8 (n:11)	%67,3 (n:111)	%65,5 (n:57)
ÇH + T1DM	%19 (n:11)	%16,3 (n:8)	%21 (n:4)	%18,2 (n:30)	%18,4 (n:16)
ÇH + Anemi	%10,3 (n:6)	%12,2 (n:6)	%10,5 (n:2)	%10,9 (n:18)	%11,5 (n:10)
ÇH + Diğer Hastalığı Olanlar	%5,17 (n:3)	-	%10,5 (n:2)	%3,6 (n:6)	%4,6 (n:4)
Toplam	%100 (n:58)	%100 (n:49)	%100 (n:19)	%100 (n:165)	%100 (n:87)
<i>p</i>	>0,05			>0,05	

Tablo 18’de ÇH ve sekonder hastalığı olanların *Foxp3* genotip ve allel frekansı gösterildi.

Marsh evreleri ile *CTLA-4* genotip ve allel frekansı Tablo 19’da verildi. Marsh evresi ve *CTLA-4* polimorfizmi arasında anlam bulunamadı ($p>0,05$).

Tablo 18. Sadece ÇH ve diğer hastalığı olanların *Foxp3* genotip ve allel frekansı.

Hastalık	Genotip			Allel	
	AA %(n:)	CA %(n:)	CC %(n:)	A Allel Frekans	C Allel Frekans
Sadece ÇH	%65,7 (n:25)	%74 (n:37)	%59,4 (n:22)	%69 (n:87)	%65,3 (n:81)
ÇH + T1DM	%21 (n:8)	%18 (n:9)	%16,2 (n:6)	%19,8 (n:25)	%16,9 (n:21)
ÇH + Anemi	%10,5 (n:4)	%6 (n:3)	%16,2 (n:6)	%8,7 (n:11)	%12 (n:15)
ÇH + Diğer Hastalığı Olanlar	%2,6 (n:1)	%2 (n:1)	%8 (n:3)	%2,3 (n:3)	%5,6 (n:7)
Toplam	%100 (n:38)	%100 (n:50)	%100 (n:37)	%100 (n:126)	%100 (n:124)
<i>p</i>	>0,05			>0,05	

Tablo 19. Marsh evrelerine göre *CTLA-4* genotip ve allel frekansı.

Marsh Evresi	Genotip			Allel	
	AA %(n:)	AG %(n:)	GG %(n:)	A Allel Frekans	G Allel Frekans
3A	%55,9 (n:33)	%37,5 (n:18)	%66,6 (n:12)	%50,6 (n:84)	%50 (n:42)
3B	%33,8 (n:20)	%54,1 (n:26)	%27,7 (n:5)	%39,7 (n:66)	%42,8 (n:36)
3C	%10,1 (n:6)	%8,3 (n:4)	%5,5 (n:1)	%9,6 (n:16)	%7,1 (n:6)
Toplam	%100 (n:59)	%100 (n:48)	%100 (n:18)	%100 (n:166)	%100 (n:84)
<i>p</i>	>0,05			>0,05	

Marsh evreleri ile *Foxp3* genotip ve allel frekansı Tablo 20’de verildi. Marsh evresi ve *Foxp3* polimorfizmi arasında anlam bulunamadı ($p>0,05$).

Tablo 20. Marsh evrelerine göre *Foxp3* genotip ve allel frekansı.

Marsh Evresi	Genotip			Allel	
	AA %(n:)	CA %(n:)	CC %(n:)	A Allel Frekansı	C Allel Frekansı
3A	%46,1 (n:18)	%48,9 (n:24)	%56,7 (n:21)	%47,2 (n:60)	%53,6 (n:66)
3B	%48,7 (n:19)	%40,8 (n:20)	%32,4 (n:12)	%45,6 (n:58)	%35,7 (n:44)
3C	%5,1 (n:2)	%10,2 (n:5)	%10,8 (n:4)	%7 (n:9)	%10,5 (n:13)
Toplam	%100 (n:39)	%100 (n:49)	%100 (n:37)	%100 (n:127)	%100 (n:123)
<i>p</i>	>0,05			>0,05	

Anabilim dalımızda Eldem ve ark. (86) daha önce aynı hasta ve kontrol grubunu dahil ettiği çalışmalarında hasta ve kontrol grubunun *HLA DQB1* frekansları araştırılmıştır. Hasta ve kontrol grubu *HLA DQB1* ve *HLA DQA1* allel frekansları ile çalışmamızdaki polimorfizimler karşılaştırıldı.

CTLA-4 gen polimorfizmi ile *DQB1* ve *DQA1* polimorfizmlerinin karşılaştırılması Tablo 21’de verildi.

CTLA-4 allel frekansı ile *DQB1*02* allel frekanslarının karşılaştırılması Tablo 22’de verildi.

Foxp3 gen polimorfizmi ile *DQB1* ve *DQA1* polimorfizmlerinin karşılaştırılması Tablo 23’de verildi.

Foxp3 allel frekansı ile *DQB1*02* allel frekanslarının karşılaştırılması Tablo 24’de verildi.

Tablo 21. Hasta ve kontrol grubunda *CTLA-4* ile *DQB1* ve *DQA1* genotip frekanslarının karşılaştırılması.

	AA	AG	GG	<i>p</i>
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *05	%43,3 n:39	35,5% n:32	13,3% n:12	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *05	%3,3 n:3	%4,4 n:4	-	
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *02	%35,9 n:14	%35,9 n:14	%15,3 n:6	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *02	%5,1 n:2	%7,6 n:3	-	
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *03/ <i>DQA1</i> *03	%25,4 n:14	%18,1 n:10	%10,9 n:6	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *03/ <i>DQA1</i> *03	%16,3 n:9	%20 n:11	%9 n:5	

Tablo 22. Hasta ve kontrol grubunda *CTLA-4* ve *DQB1**02 allel frekansları.

	A Allel Frekansı	G Allel Frekansı	<i>p</i>
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *02	%58,9 n:152	%31,8 n:82	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *02	%6,6 n:17	%2,7 n:7	

Tablo 23. Hasta ve kontrol grubunda *Foxp3* ile *DQB1* ve *DQA1* genotip frekanslarının karşılaştırılması.

	AA	CA	CC	<i>p</i>
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *05	%28,8 n:26	%32,2 n:29	%31,1 n:28	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *05	-	%4,4 n:4	%3,3 n:3	
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *02	%26,3 n:10	%34,21 n:13	%26,3 n:10	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *02/ <i>DQA1</i> *02	%5,26 n:2	%5,26 n:2	%2,6 n:1	
Hasta Grubu <i>DQB1</i> *03/ <i>DQA1</i> *03	%7,2 n:4	%25,4 n:14	%21,8 n:12	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1</i> *03/ <i>DQA1</i> *03	%16,3 n:9	%14,5 n:8	%14,5 n:8	

Tablo 24. Hasta ve kontrol grubunda *Foxp3* ve *DQB1*02* allel frekansları.

	A Allel Frekansı	C Allel Frekansı	<i>p</i>
Hasta Grubu <i>DQB1*02</i>	%44,5 n:114	%46,1 n:118	>0,05
Kontrol Grubu <i>DQB1*02</i>	%3,9 n:10	%5,5 n:14	



TARTIŞMA

Çölyak Hastalığı; yaş, cinsiyet, genetik yatkınlık, immünolojik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı, multifaktöriyel ve multisistemik otoimmün bir hastalıktır. ÇH, nüfusun yaklaşık %1'ini etkiler. Dünya genelinde prevalans farklılıkları vardır. Almanya'da ÇH görülme sıklığı diğer Avrupa ülkelerine göre daha düşükken, en yüksek prevalans İsveç ve Finlandiya'dadır (5). 1975-2000 yılları arasında şu anda bilinmeyen nedenlerle ABD'de ÇH görülme sıklığının 5 kat arttığı gösterilmiştir (1). Ülkemizdeki ÇH görülme sıklığının ise %1.30 olduğu belirtilmiştir (7). Ayrıca hastalığın kadınlarda erkeklerden daha sık görüldüğü bildirilmiştir (8). Bu doğrultuda bizim çalışmamıza dâhil olan hastalardan kız çocuklarının erkek çocuklara oranı %57,6 idi.

ÇH'nin çocuklarda görülme sıklığı %0,3-2,9'dur (6). 2010 yılında yayınlanmış bir çalışmaya göre Türkiye'de 6-17 (20.190) yaş okul çağındaki çocuklarda ÇH sıklığı 1/212 olarak bulunmuştur (11). Yine ülkemizde 2008 yılındaki bir çalışmada 1-18 yaş arası 1.000 çocukta hastalığın görülme sıklığı %0,9 olarak bulunmuştur (12). Çalışmamızda hastalığın başlangıç yaşı kız çocuklarında 8, erkek çocuklarında 7, genel ortalama 7,5 olarak bulunmuştur.

ÇH, multigenik bir hastalıktır. Genetik faktörler arasında hastalığın kalıtsal olmasına esas katkı (İnsan Lökosit Antijenleri) *HLA*'dır (19). ÇH olan kişilerin %90'ından fazlasının *HLA-DQ2* haplotipine ve kalanların çoğunun *HLA-DQ8* haplotipine sahip olduğu bildirilmiştir (5). Ancak *HLA* ilişkili moleküllerin ÇH'nin kalıtsallığına %40 katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (13). İsveç'te 107.000 kişi ile yapılan bir çalışmanın sonucuna göre *HLA* dışındaki genetik faktörlerin ÇH riskini %68 etkilediği sonucuna varılmıştır (37). GWAS ile, *HLA* ile ilişkili olmayan 40'tan fazla lokusun ÇH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (38). ÇH ile ilgili aday gen bölgelerinin belirtildiği bir yayında *CTLA-4* geni de aday genler arasında yerini almıştır (45,46). *CTLA-4*, periferik toleransta ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde önemli olan T hücre aktivasyonunun inhibe edilmesinde rol alır (66).

Çölyak hastalarında, *CTLA-4* geni 1. ekzon 49. pozisyonunda bir polimorfizm belirlenmiştir. Buradaki A/G değişimi sonucu A allelinin çölyak hastalıklı bireylerde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede fazla ifade edildiği ve AA

homozigotlarının frekansının, hastalarda kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (2).

Djilali-Saiah ve ark. (87) 101 hasta ve 103 sağlıklı kontrol grubu ile Fransız popülasyonunda yaptıkları bir vaka kontrol çalışması ile *CTLA-4*'ün ÇH duyarlılığında rol oynayabileceğini öne süren ilk kişilerdi. Çalışmalarının sonucunda ekzon 1'deki 49. pozisyonda A allelinin varlığı ile hastalık arasında güçlü bir ilişki bulmuşlardır. İsveç'te 2002 yılında yayınlanan bir çalışmada A allel frekansı ÇH olan kişilerde daha fazla olduğu (%67) bildirilmiştir (88). Mora ve ark. İtalyan popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada Çölyak hastalarında A allelinin önemli derecede fazla bulunduğunu bildirmişlerdir (89). Yine İskandinav popülasyonunda yaptıkları çalışmada Naluai ve ark. +49 A alleli ile ÇH arasında ilişki bulduklarını göstermiştir (88). Bu sonuçlar doğrultusunda bizim de Türk popülasyonunda yaptığımız çalışmamızda, çölyak hastalarında A allel frekansı daha fazla bulundu. İstatistiksel olarak kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olmadığı gözlemlendi, küçük örneklem büyüklüğü, düşük istatistiksel güç ve / veya klinik heterojenlik etkisinin olduğu düşünülmektedir. Daha anlamlı sonuçların elde edilmesi için örnek sayısının artırılması, serum düzeylerinin incelenmesi, farklı demografik koşulların dâhil edilmesi gereklidir.

Bazı popülasyonlarda +49 A/G polimorfizmi ile ÇH arasında önemli derecede ilişki bulunduğu bildirilirken, bazılarında herhangi bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Bunun bir örneği olarak Avrupa'da ÇH ile ilgili yapılmış 13 ayrı çalışmayı karşılaştıran bir meta-analizde ÇH ile +49 A/G polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamadığı bildirilmiştir (68). Yine Holopainen ve ark. (90) Finlandiya popülasyonunda yaptıkları çalışmada A/G polimorfizmi ile ÇH arasında ilişki bulamamıştır. Literatürde A allelinin Çölyak hastalarında daha fazla bulunduğu tespit edilse de, Alman popülasyonunda yapılan bir başka çalışmada Çölyak hastalarında G allel frekansının daha fazla olduğu ve GG genotipinin daha sık görüldüğü bildirilmiştir (91). Çalışmamızda da GG genotipi ve G allel frekansı hasta grubunda kontrol grubuna göre fazla görünse de anlamlı değildir.

CTLA-4 +49 GG genotipi, *CTLA-4*'ün inhibitör fonksiyonunda azalmaya neden olur (92). Bu nedenle, GG genotipi, Th1 hücre proliferasyonunda bir artışa ve otoimmün hastalıkların gelişmesine neden olabilir (93). ÇH'de Th1 hücreleri büyük

miktarlarda IFN- γ üretirler ve sonuçta ÇH'nin karakteristik mukozal lezyonlarına yol açabilirler (63). Buna karşın hem CTLA-4 proteini hem de mRNA düzeylerinin +49 AA genotipinde önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (93). Literatüre bakıldığında A allelinin Çölyak hastalarında daha fazla bulunduğu görülmektedir. Bunun sonucunda CTLA-4 +49 A polimorfizminin hastalığın şiddeti ile ilişkisi olmadığı sonucu düşünülebilir. Bu durum ÇH'de polimorfizm çalışmalarının devamında ekspresyon seviyelerine de bakılarak araştırılmalıdır.

Literatür araştırmalarımızda hastalık evresi ile CTLA-4 +49 A/G polimorfizminin ilişkisinin incelendiği bir çalışma bulunamadı. 2013 yılındaki bir meta-analizde CTLA-4 polimorfizmleri ile ÇH şiddeti arasındaki ilişkinin eldeki verilerin az olmasından dolayı analizinin yapılamadığı bildirilmiştir (69). Çalışmamızda hastalık evresi açısından CTLA-4 +49 A/G polimorfizmi incelendiğinde istatistiksel olarak anlam bulunamadı. Dolayısıyla bu durum hastalık evresi ile CTLA-4 +49 A/G polimorfizminin detaylı olarak tartışılmasını sınırlamaktadır.

ÇH'de HLA moleküllerinin de etkisi olduğu bilinmektedir. Güncel çalışmalar yüksek oranda HLA sınıf II'nin ÇH'de etikili olduğunu göstermektedir. Birçok çalışmada DQB1*02'nin hasta popülasyonunda daha fazla olduğu görülmektedir (86). Çalışma grubumuzdaki örneklerde hasta grubunun HLA DQB1*02 frekansının kontrollere göre yüksek olduğu Eldem ve arkadaşları tarafından saptanmıştı ($p < 0,05$) (86).

Çalışmamızda CTLA-4 +49 A/G polimorfizmi ile HLA DQB1 allel frekanslarının birlikte ÇH'ye etkisi değerlendirildiğinde ($p > 0,05$) kontrol grubunda DQB1*02 alleleline sahip bireylerde GG genotipine rastlanmadı. CTLA-4 +49 GG genotipinin ÇH patogeneğinde mukozal lezyonlara yol açabildiği bilinmektedir. Kontrol grubumuzda DQB1*02 alleli ile birlikte GG genotipine sahip birey olmadığından, sağlıklı bireylerin ÇH'ye karşı riskli genotip olan GG'nin etkisinden korundukları sonucu düşünülebilir.

Ülkemizde ÇH ile ilgili yapılmış polimorfizm çalışmalarının sayısı azdır. ÇH ile CTLA-4 polimorfizminin araştırıldığı bir başka çalışma bulunmamaktadır. Farklı popülasyonlarda yapılan çalışmaların sonuçları değişkendir. Çalışmamız CTLA-4 geni

+49 A/G polimorfizminin Türk popülasyonunda Çölyak hastalarında incelendiği ilk çalışma olduğundan literatüre ve ülke verisine katkı sunmaktadır.

Foxp3 geni Treg hücrelerinin gelişimi ve işlevi için gereklidir. Çölyak hastalarının bağırsak mukozasında *Foxp3*⁺ T hücrelerinin sayısının önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. *Foxp3* ekspresyonunun, gliadine karşı Th1 hücrelerinin yürüttüğü mukozal immün yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (63). *Foxp3*, kromozomal konumu ve fonksiyonel rolüne bağlı olarak otoimmün hastalıklar için aday bir genidir (82). -3279 C/A polimorfizmi promotör bölgesinde bulunduğundan hücrelerdeki protein ekspresyonunun seviyesini doğrudan veya dolaylı olarak değiştirebilir (94). -3279 C/A polimorfizminin AA genotipi, bazı transkripsiyon faktörleri ile bağlanma kaybına neden olarak *Foxp3*'ün hatalı transkripsiyonuna yol açar. Ayrıca, bu polimorfizmin A alleli, C allele kıyasla lusiferaz aktivitesinde belirgin bir azalma ile ilişkilidir (80). -3279 C/A polimorfizmi promotör bölgesinde bulunduğu ve buradaki polimorfizmin gen ifadesini değiştirebileceği bilindiğinden, çalışmamızda -3279 C/A polimorfizmi seçilmiştir. Bununla birlikte, *Foxp3* gen polimorfizminin otoimmün hastalıkların patogenezi etkilediği kesin mekanizma henüz belirlenmemiştir (94). Ayrıca, *Foxp3* -3279 C/A rs3761548 polimorfizminin, protein ekspresyon düzeylerini etkileyip etkilemediğini araştırmak ve Treg hücre aktivitesinin düzenlenmesinde *Foxp3* proteininin rolünü belirlemek için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç vardır.

Foxp3 polimorfizmi ile otoimmün hastalıkların ilişkisini inceleyen bir meta-analizde 22 ayrı çalışma karşılaştırılmış. *Foxp3* (GT)₁₅ ve *Foxp3* (GT)₁₆ allelleri ile otoimmün hastalıklar arasında bir ilişki bulunamamıştır (82). Tip I diyabet (T1DM) ile ÇH'nin birlikte araştırıldığı bir çalışmada *Foxp3* polimorfizmi ile bu hastalıklar arasında bir ilişkinin bulunamadığı bildirilmiştir (95). Ancak, *Foxp3* -3279 C/A polimorfizminin Asyalılarda ve beyaz ırktan olmayanlarda otoimmün hastalığa yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (82).

Literatür araştırmalarımızda ÇH ile *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmi ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunamadı. Hangi genotiplerin ve hangi allel frekanslarının hastalarda daha fazla bulunduğu bilinmemektedir. Dolayısıyla bu durum çalışmanın detaylı olarak tartışılmasını sınırlamaktadır.

Ancak diğer otoimmün hastalıklar ile *Foxp3* -3279 C/A AA + AC genotipi arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır. *Foxp3* -3279 A allelinin, C alleleine kıyasla *Foxp3*'ün hatalı transkripsiyonuna neden olarak, transkripsiyon faktör bağlanma kaybı ve lusiferaz aktivitesinde dramatik bir azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (82). Otoimmün hastalıklarda *Foxp3* -3279 C/A polimorfizminin karşılaştırıldığı, 2013 yılında yayınlanan bir meta-analizde *Foxp3* -3279 A allelinin otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (94). Çalışmamızda literatüre paralel olarak hasta grubunda A allel frekansı daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı. *Foxp3* -3279 C/A polimorfizminde C alleli yabancı tip iken A alleli otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilen risk allelidir. Risk alleli hasta ve kontrol grubunda CA ve AA genotipine sahip kişiler ile sadece CC genotipine sahip kişiler arasında kıkare testi yapılarak incelenir. Hasta ve kontrol grubunda risk alleleine bakıldığında ise hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *Foxp3* polimorfizminin çeşitli otoimmün hastalıklarda çalışıldığı bazı araştırmalarda ilişkili olduğu, ancak diğer bazı çalışmalarda herhangi bir ilişki bulunmadığı görülmüştür. Yine bu farklılıklar küçük örneklem büyüklükleri, düşük istatistiksel güç ve / veya klinik heterojenlikten kaynaklanmaktadır. Bu doğrultuda daha fazla örnek ile çalışılması, farklı coğrafyalardan popülasyonların dâhil edilmesi daha anlamlı sonuçlar verecektir. Ayrıca, bu farklılıkların belirlenmesi ile klinikte tanı ve tedaviye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Literatür araştırmalarımızda hastalık evresi ile *Foxp3* -3279 C/A polimorfizminin ilişkisinin incelendiği bir çalışma bulunamadı. Çalışmamızda hastalık evresi açısından *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmi incelendiğinde istatistiksel olarak anlam bulunamadı. Dolayısıyla bu durum hastalık evresi ile *Foxp3* -3279 C/A polimorfizminin detaylı olarak tartışılmasını sınırlamaktadır.

Çalışmamızda *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmi ile *HLA DQB1* allel frekansları karşılaştırıldı. *Foxp3* polimorfizminde riskli genotipler olan AA ve CA genotipleri ile *DQB1**02 allelinin birlikte ÇH'ye etkisi değerlendirildiğinde genotipler arası önemli bir farklılık saptanmadı.

ÇH multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik faktörlerin haricinde beslenmenin de ÇH patogenezinin etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca otoimmün hastalıklar başka

otoimmün hastalıkların meydana gelmesine neden olabilirler. Örneğin gluten tüketimi sonucu ortaya çıkabilen anormal immünolojik yanıt, farklı sistemleri etkileyebilmektedir (38). ÇH olan kişilerde, sağlıklı bireylere göre eşzamanlı otoimmün hastalıklar daha sık gözlenmektedir. Otoimmün hastalıkları olan hastalar, özellikle diyabet veya tiroid hastalığı olanlarda, sıklıkla ÇH'ye sahiptir. Tip 1 diyabet (T1DM), ÇH ile ilişkili en şiddetli otoimmün hastalıklardan biridir. ÇH olan hastaların yaklaşık %5'inde T1DM bulunduğu bildirilmiştir (38). Bu bilgiler doğrultusunda bizim çalışma grubumuzda ÇH ile birlikte T1DM olan hastaların oranının %18,4 olduğu görüldü. Ayrıca ÇH ile birlikte Anemi olan hastaların oranı da %10,4 olarak saptandı.



SONUÇ VE ÖNERİLER

ÇH'de *HLA* dışı genlerden *CTLA-4* geni +49 A/G, ve *Foxp3* geni -3279 C/A polimorfizmlerini araştırdığımız çalışmamızda literatür ile aynı doğrultuda sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre *CTLA-4* geninde A allelinin ve *Foxp3* geninde A allelinin kontrol grubuna göre daha fazla görüldüğü saptanmıştır. İstatistiksel açıdan her iki gen polimorfizmi için de anlam bulunamamıştır. Bunun sebebi düşük örneklem büyüklüğü, düşük istatistiksel güç veya klinik heterojenlikten kaynaklanmaktadır. Daha anlamlı sonuçlar elde etmek için daha fazla örnek ile çalışılması, farklı coğrafyalardan popülasyonların dâhil edilmesi ve serum düzeylerinin de araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

CTLA-4 ve *Foxp3* genlerindeki polimorfizmlerin gen ve protein ekspresyonlarını etkilemesi muhtemeldir. Bu nedenle bu genlerin ekspresyon seviyeleri de ölçülerek değerlendirme yapılabilir. Elde edilen sonuçlar daha sonraki çalışmalara ve literatüre katkı sağlayacaktır.

Literatüre bakıldığında ÇH'de çok sayıda *HLA* ilişkili genler çalışılmıştır, *HLA* ile ilişkili olmayan gen çalışmalarının sayısı azdır. Bu durum genotip ve allel frekanslarının karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Ancak GWAS ile *non-HLA* 40'tan fazla lokusun ÇH ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu doğrultuda ÇH'de *non-HLA* genlerin daha fazla çalışılması literatüre katkı sağlayacaktır.

Ülkemizde daha önce ÇH'de *CTLA-4* ve *Foxp3* gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Daha fazla sayıda *non-HLA* genlerinin araştırıldığı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Özellikle, ÇH'de *Foxp3* -3279 C/A polimorfizmi ilk defa çalışmamızda araştırıldı. Bu doğrultuda literatüre ve gelecek çalışmalara katkı sağlayacağımızı düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Caio G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Med.* 2019;17(1): 1–20.
2. Soya S, Ün C. Çölyak hastalığındaki moleküler ve genetik gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2014;57: 274-282
3. Schuppan D, Zimmer KP. Diagnostik und therapie der zöliakie. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110: 835-846.
4. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997;3(7): 797–801.
5. Lebowitz B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *Lancet.* 2018;391(10115): 70–81.
6. Taraghikhah N, Ashtari S, Asri N, et al. An updated overview of spectrum of gluten-related disorders: Clinical and diagnostic aspects. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1): 1–12.
7. Tayfur M. Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2010-2018 Yılları Arasında Tanı Alan Erişkin Çölyak Hastalarının Değerlendirilmesi. *Sakarya Tıp Dergisi.* 2020;10(1): 37-43.
8. Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(10): 1587–92.
9. Biagi F, Corazza GR. Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(3): 158–62.

10. Lebwohl B, Green PHR, Söderling J, Roelstraete B, Ludvigsson JF. Association between Celiac Disease and Mortality Risk in a Swedish Population. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(13): 1277–85.
11. Dalgic B, Sari S, Basturk B, et al. Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(8): 1512–7.
12. Demirçeken F.G, Kansu A, Kuloğlu Z ve ark. Human tissue transglutaminase antibody screening by immunochromatographic line immunoassay for early diagnosis of celiac disease in Turkish children. *Turk J Gastroenterol.* 2008;19(1): 14–21.
13. Ludvigsson JF, Murray JA. Epidemiology of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019;48(1): 1–18.
14. Demirçeken FG. Gluten Enteropatisi (Çölyak Hastalığı): Klasik Bir Öykü ve Güncel Gelişmeler. *Güncel gastroenteroloji.* 2011;15(1): 58–72.
15. Ribeiro M, de Sousa T, Poeta P, Bagulho AS, Igrejas G. Review of structural features and binding capacity of polyphenols to gluten proteins and peptides in vitro: Relevance to celiac disease. *Antioxidants.* 2020;9(6): 463.
16. Biesiekierski JR. What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;32: 78–81.
17. Marasco G, Ciota GG, Rossini B, et al. Probiotics, Prebiotics and Other Dietary Supplements for Gut Microbiota Modulation in Celiac Disease Patients. *Nutrients.* 2020;12.9: 1–17.
18. Bascuñán KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr.* 2017;56(2): 449–59.
19. Pes GM, Bibbò S, Dore MP. Coeliac disease: beyond genetic susceptibility and gluten. A narrative review. *Ann Med.* 2019;51(1): 1–16.
20. Tonutti E, Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5): 472–6.
21. See JA, Kaukinen K, Makharia GK, Gibson PR, Murray JA. Practical insights into gluten-free diets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(10): 580–91.

22. Itzlinger A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-free diet in celiac disease—forever and for all? *Nutrients*. 2018;10(11): 1–14.
23. Ertaş-Öztürk Y, Karabudak E. Çocuk Çölyak Hastalarında Glutensiz Diyet ve Mikrobiyota Odaklı Tedavilerin İntestinal Mikrobiyotaya Etkisi. *J Nutr Diet*. 2019;47(2): 1–6.
24. Bonder MJ, Tigchelaar EF, Cai X, et al. The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1): 1–11.
25. Drabińska N, Jarocka-Cyrta E, Markiewicz LH, Krupa-Kozak U. The effect of oligofructose-enriched inulin on faecal bacterial counts and microbiota-associated characteristics in celiac disease children following a gluten-free diet: Results of a randomized, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2018;10(2): 1–11.
26. Plot L, Amital H. Autoimmunity Reviews Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2009;8(4): 316–9.
27. Kårhus LL, Gunnes N, Størdal K, et al. Influenza and risk of later celiac disease: a cohort study of 2.6 million people. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(1): 15–23.
28. Satta R, Pes GM, Colosso Q, et al. Skin manifestations in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2018;32.8: 305-306.
29. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, et al. Rotavirus Infection Frequency and Risk of Celiac Disease Autoimmunity in Early Childhood : A Longitudinal Study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(10): 2333–2340.
30. Canova C, Zabeo V, Pitter G, et al. Association of Maternal Education , Early Infections and Antibiotic Use With Celiac Disease: A Population-Based Birth Cohort Study in Northeastern Italy. *Am J Epidemiol*. 2014;180(1): 76–85.
31. Riddle MS, Murray JA, Cash BD, Pimental M, Porter CK. Pathogen-Specific Risk of Celiac Disease Following Bacterial Causes of Foodborne Illness: A Retrospective Cohort Study. *Dig Dis Sci*. 2013;58(11): 3242-3245.

32. De Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J. Leukoc Biol.* 2010;87(5): 765-778
33. Wacklin P, Makivuokko H, Alakulppi N, et al. Secretor Genotype (FUT2 gene) Is Strongly Associated with the Composition of Bifidobacteria in the Human Intestine. *PLoS ONE.* 2011;6(5): e20113.
34. Pozo-rubio T, Palma G De, Mujico JR, et al. Influence of early environmental factors on lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk of celiac disease; the PROFICEL study. *Nutr Hosp.* 2013;28(2): 464-474.
35. De Palma G, Capilla A, Nova E et al. Influence of Milk-Feeding Type and Genetic Risk of Developing Coeliac Disease on Intestinal Microbiota of Infants : The PROFICEL Study. *PLoS ONE.* 2012;7(2): e30791.
36. Caio G, Lungaro L, Segata N, et al. Effect of gluten-free diet on gut microbiota composition in patients with celiac disease and non-celiac gluten/wheat sensitivity. *Nutrients.* 2020;12(6): 1–23.
37. Kuja-Halkola R, Lebwohl B, Halfvarson J, et al. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: A population-based study in 107 000 twins. *Gut.* 2016;65(11): 1793–8.
38. Lundin KEA, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease - Genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(9): 507–15.
39. Gutierrez-achury J, Zhernakova A, Pulit SL et al. Fine-mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nat Genet.* 2015; 47(6): 577–578
40. Kumar V, Wijmenga C, Xavier RJ. Genetics of immune-mediated disorders: from genome-wide association to molecular mechanism. *Curr Opin Immunol.* 2014;31: 51-57.

41. Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin. Immunopathol.* 2012;34: 567–580.
42. Wijmenga C, Gutierrez-achury J. Celiac Disease Genetics: Past, Present and Future Challenges. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2014;59: 4-7.
43. Leonard, Maureen M, et al. Genetics and celiac disease: the importance of screening. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* 2015;9(2): 209-215.
44. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S et al. Identification of human zonulin , a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(39): 16799-16804.
45. Serena G, Lima R, Fasano A. Genetic and Environmental Contributors for Celiac Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(9): 1–10.
46. Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun.* 2015;64: 26–41.
47. Adelman DC, Murray J, Wu TT, et al. Measuring change in small intestinal histology in patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol .* 2018;113(3): 339–47.
48. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(1): 136–60.
49. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013;62(1): 43–52.
50. Dai Y, Zhang Q, Olofson AM, Jhala N, Liu X. Celiac disease: Updates on pathology and differential diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2019;26(5): 292–312.
51. Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: Simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med.* 2010;123(8): 691–3.

52. Abbas A, Lichtman A, Shiv P. Immunologic Tolerance and Autoimmunity. In: Cellular and molecular immunology. ninth edit. Saunders Elsevier; 2007: 325–48.
53. Marson A, Housley WJ, Hafler DA. Genetic basis of autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015;125(6): 2234–41.
54. Khan U, Ghazanfar H. T Lymphocytes and Autoimmunity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;341: 125–68.
55. Alroqi FJ, Chatila TA. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(4): 1–8.
56. Tao JH, Cheng M, Tang JP, et al. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation.* 2017;40(1): 328–39.
57. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018;19(7): 665–73.
58. Togashi Y, Hiroyoshi N. Regulatory T cells: molecular and cellular basis for immunoregulation. In: *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity.* Springer, Cham. 2017: 3–27.
59. Kawai K, Uchiyama M, Hester J, Wood K, Issa F. Regulatory T cells for tolerance. *Hum Immunol.* 2018;79(5): 294–303.
60. Yang L, Wang G, Xia H. Molecular mechanism for impaired suppressive function of Tregs in autoimmune diseases: A summary of cell-intrinsic and cell-extrinsic factors. *J Cell Mol Med.* 2020;24(19): 11056–63.
61. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, et al. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(7): 1308–17.
62. Cukrowska B, Sowińska A, Bierła JB, et al. Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2017;23(42): 7505–18.

63. Mazzarella G. Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2015;21(24): 7349–56.
64. Aksoy ZB, Soydemir E. Güncel gastroenteroloji. 2017;21/1(6): 9–13.
65. Yoshimura A. Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity. Vol. 410, *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer. 2017;410.
66. Mitsuiki N, Schwab C, Grimbacher B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? *Immunol Rev.* 2019;287(1): 33–49.
67. Çelmeli F, Türkkahraman D, Özel D, Akçurin S, Yeğin O. Diabetes in Turkish Children. *J Clin Pediatr Endocrinol.* 2013;5(1): 40–3.
68. Verma N, Burns SO, Walker LSK, Sansom DM. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. *Clin Exp Immunol.* 2017;190(1): 1–7.
69. Song GG, Kim JH, Kim YH, Lee YH. Association between CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to Celiac disease: A meta-analysis. *Hum Immunol.* 2013;74(9): 1214–8.
70. Hou TZ, Qureshi OS, Sansom DM. Measuring CTLA-4 dependent suppressive function in regulatory T cells. In: *Immunological Tolerance.* NY: Humana Press; 2019: 87–101.
71. Tang W, Wang Y, Chen S, et al. Investigation of Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 Polymorphisms in Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Scand J Immunol.* 2016;83(3): 212–8.
72. Zhao Y, Yang W, Huang Y, et al. Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(2): 721–34.

73. Tu Y, Fan G, Dai Y, et al. Association between rs3087243 and rs231775 polymorphism within the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and Graves' disease: A case/control study combined with meta-analyses. *Oncotarget*. 2017;8(66): 110614–24.
74. Maiuri L, Auricchio S, Coletta S, et al. Blockage of T-cell costimulation inhibits T-cell action in celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(3): 564–72.
75. Naluai ÅT, Nilsson S, Samuelsson L, et al. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens*. 2000;56(4): 350–5.
76. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(11): 703–17.
77. Pereira LMS, Gomes STM, Ishak R, et al. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. *Front Immunol*. 2017;8: 605.
78. Deng G, Song X, Greene MI. FoxP3 in Treg cell biology: a molecular and structural perspective. *Clin Exp Immunol*. 2020;199(3): 255–62.
79. Passerini L, Santoni De Sio FR, Roncarolo MG, Bacchetta R. Forkhead box P3: The peacekeeper of the immune system. *Int Rev Immunol*. 2014;33(2): 129–45.
80. Oda JMM, Hirata BKB, Guembarovski RL, Watanabe MAE. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: Imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *J Genet*. 2013;92(1): 163–71.
81. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: A lesson on immune dysregulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1417(1): 5–22.
82. Lee MG, Bae SC, Lee YH. Association between FOXP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis. *Autoimmunity*. 2015;48(7): 445–52.

83. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1): 20-21.
84. Fathima N, Narne P, Ishaq M. Association and gene–gene interaction analyses for polymorphic variants in CTLA-4 and FOXP3 genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Endocrine.* 2019;64(3):591–604.
85. Chatrabnous N, Ghaderi A, Ariaifar A, et al. Serum concentration of interleukin-35 and its association with tumor stages and FOXP3 gene polymorphism in patients with prostate cancer. *Cytokine.* 2019;113(July 2018):221–7.
86. Eldem A, Kılıçaslan Ayna T, Baran M, Soyöz M, Pirim İ. Determination of High-Resolution HLA-DQB1 Suballeles and IL-17 Polymorphisms in Turkish Pediatric Patients. *J Pediatr Genet.* 2021.
87. Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, et al. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut.* 1998;43(2): 187–9.
88. Popat S, Hearle N, Wixey J, et al. Analysis of the CTLA4 gene in Swedish coeliac disease patients. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(1): 28–31.
89. Mora B, Bonamico M, Indovina P, et al. CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol.* 2003;64(2): 297–301.
90. Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, et al. CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens.* 1999;53(5): 470–5.
91. van Belzen MJ, Mulder CJJ, Zhernakova A, et al. CTLA4 + 49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(9): 782–5.
92. Bilbao-Aldaiturriaga N, Patino-Garcia A, Martin-Guerrero I, et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 rs231775 polymorphism and osteosarcoma. *Neoplasma.* 2017;64(2): 299-304.

93. Sallakci N, Bacanli A, Coskun M, et al. CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. *Exp Dermatol.* 2005;30(5): 546–50.
94. He Y, Huang N, Li Y, Qiu Z, Li W. FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. *Hum Immunol.* 2013;74(12): 1665–71.
95. Bjørnvold M, Amundsen SS, Stene LC, et al. FOXP3 polymorphisms in type 1 diabetes and coeliac disease. *J Autoimmun.* 2006;27(2): 140–4.

