

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANDAS'LI HASTALARDA TNF- α GEN POLİMORFİZMİ

Biyolog Dilge ONATOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP

ADANA-2008

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PANDAS'LI HASTALARDA TNF-A GEN POLİMORFİZMİ

Biyolog Dilge ONATOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2007YL2 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

ADANA-2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “PANDAS’lı Hastalarda TNF- α Gen Polimorfizmi” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/08/2008

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN
Çukurova Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Ayşegül Yolga Tahiroğlu
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, yönetim kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde beni yönlendiren, tez çalışmalarımda bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen, danışman hocam olduğu için her zaman gurur duyduğum değerli bilim adamı Sayın Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan, başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Osman DEMİRHAN olmak üzere, tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerimize teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarımızda bize destek veren Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı Ayşe Avcı ve tez örneklerimizin sağlanmasında bize özverili yaklaşım gösteren Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Yolga Tahiroğlu'na içten teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmamızın kontrol grubu kanlarının toplanması sırasında yardımını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nurdan Evliyaoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızın istatistik analizlerde benden yardımlarını esirgemeyen Fen-Edebiyat Fakültesi İstatistik bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. Hamza Erol ve Biyoistatistik Ana Bilim Dalı öğretim görevlisi Doç. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı ile ortak yürüttüğümüz kısımlarını gerçekleştirmemde bana yardımcı olan Biyolog Dr. Salih Çetiner'e teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar, gerekse ders aşamasında her türlü desteklerini esirgemeyen, Öğr. Gör. Ali İrfan GÜZEL ve Uzman Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na teşekkür ederim. Çalışmalarım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Biyolog Sabriye Kocatürk Sel'e teşekkür ederim. Beni bugünlere getiren, her türlü anlayış ve desteklerini esirgemeyen ve sonuna kadar yanımda olacaklarına inandığım aileme, özellikle hayatımda benim için çok özel ve doldurulamaz yeri olan canım anneme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. PANDAS (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections)	4
2.2. Nöronların apoptozu ve Tümör Nekroz Faktörün İmmün Cevaptaki Rolü	5
2.3. TNF- α	6
2.3.1. TNF- α Geni	7
2.3.2. Ökaryot genlerinde promotor bölgeleri	8
2.3.3. TNF- α Gen Ekspresyonu	9
2.3.4. Bağışıklık sistemi ve elemanları	11
3. İnterlökin-TNF- α İlişkisi	13
4. TNF ve Apoptoz Mekanizması	14
5. HLA (MHC=İNSAN LÖKOSİT ANTİJENİ)	15
5.1. İmmün tanıma	16
6. PANDAS'da Tedavi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.2. Gereç	17
3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler	18
3.4. Yöntem	19
3.4.1. DNA İzolasyonu	19
3.4.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi	19

3.4.2. TNF- α geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu	20
3.4.2.1. TNF- α geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri İçin Kullanılan Primer dizileri	20
3.4.2.2. TNF- α geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri İçin Kullanılan PCR Reaksiyonu	22
3.4.3. % 2'lik Agaroz Jel Elektroforezi	24
3.4.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz enzimleri ile Kesimi	24
3.4.5. %10'luk Poliakrilamid Jeli Hazırlama	25
3.4.6. İstatistiksel Analiz Yöntemi	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
7. KAYNAKLAR	42
EKLER	46
EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı	46
1.1. Lizis Tamponu	46
1.2. Fizyolojik Tampon	47
1.3. TE-9	47
1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat)	47
1.5. Proteinaz K	47
1.6. % 70'lik Etil Alkol	48
1.7. Akrilamid Hazırlama	48
EK-2. PCR	49
2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları	50
2.1.1. Kalıp Genomik DNA	50
2.1.2. Primerler	50
2.1.3. Reaksiyon Tamponu	50
2.1.4. DNA Polimeraz	50
2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)	51
EK-3. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	6. kromozom ve MHC lokusu (6p21.3)	7
Şekil 2	TNF- α geninin 6. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	7
Şekil 3	TNF- α geninin intron ve ekzonları	8
Şekil 4	Gen yapısı	8
Şekil 5	TNF- α gen yapısı	10
Şekil 6	TNF alfanın kristal yapısı	14
Şekil 7	-308 G/A polimorfizmde polimorfik genotipin (AA) PAGE görüntüsü	29
Şekil 8	-850 C/T polimorfizmde normal (CC) ve polimorfik (CT,TT) genotiplerin PAGE görüntüsü	32
Şekil 9	-850 C/T polimorfizmde normal (CC) ve polimorfik (CT) genotiplerin PAGE görüntüsü	33
Şekil 10	-850 C/T polimorfizmde normal genotipin (CC) PAGE görüntüsü	33

ÇİZELGELER ve TABLOLAR DİZİNİ

Çizelge 1	-308 G/A ve -850 C/T PCR-RFLP Primerleri	21
Çizelge 2	-308 G/A Polimorfizmi için uygulanan PCR Reaksiyon ısısı döngüleri	23
Çizelge 3	-850 C/T Polimorfizmi için uygulanan PCR Reaksiyon ısısı döngüleri	23
Tablo 1	TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi	10
Tablo 2	TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi ve primerler (-308 G/A)	21
Tablo 3	TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi ve primerler (-850 C/T)	22
Tablo 4	Cinsiyetin hasta ve kontrol grupları içindeki dağılımı	26
Tablo 5	Hasta ve kontrol grubunun -308 G/A ve -850 C/T polimorfizm genotipleri	26
Tablo 6	Hasta grubuna ait -308 G/A polimorfizminin genotip yüzdeleri	28
Tablo 7	Kontrol grubuna ait -308 G/A polimorfizminin genotip yüzdeleri	29
Tablo 8	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A hasta ve kontrol grubundaki kızlar arasındaki ilişkisi	30
Tablo 9	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A hasta grubundaki erkekler ve kontrol grubundaki erkekler arasındaki anlamlı olmayan ilişkisi	30
Tablo 10	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin hastalıkla olan pozitif anlamlı ilişkisi	30
Tablo 11	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin kontrol grubu ile pozitif anlamlı ilişkisi	31
Tablo 12	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin hasta ve kontrol grupları ile pozitif anlamlı ilişkisi	31
Tablo 13	Hasta grubuna ait -850 C/T polimorfizminin genotip yüzdeleri	31
Tablo 14	Kontrol grubuna ait -850 C/T polimorfizminin genotip yüzdeleri	32
Tablo 15	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T hasta grubundaki kızlar ve kontrol grubundaki kızlar arasındaki pozitif anlamlı ilişkisi	34
Tablo 16	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T hasta grubundaki erkekler ve kontrol grubundaki erkekler arasındaki anlamlı olmayan ilişkisi	34
Tablo 17	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T	

	polimorfizminin hasta grubu ile pozitif anlamlı ilişkisi	34
Tablo 18	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan ve -850 C/T polimorfizminin kontrol grubu ile olan pozitif anlamlı ilişkisi	35
Tablo 19	Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan ve -850 C/T polimorfizminin hasta ve kontrol grupları ile olan pozitif anlamlı ilişkisi	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
APS	Amonyum Persülfat
Bç	Baz çifti
C	Sitozin
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
G	Gram
G	Guanin
HCl	Hidroklorik asit
H₂O	Su
IFN	Interferon
IL	Interlökin
Kb	Kilobaz
µl	Mikrolitre
Mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
mRNA	Messenger RNA
Nacl	Sodyum Klorür
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PANDAS	Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections (Streptokok enfeksiyonu ile ilişkili Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalıklar)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonları konsantrasyonu
RA	Romatizmal Ateş
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
Rpm	Rote Per Minute
SK	Sydenham Koresi
Sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA tamponu
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α Geni	Tümör Nekroz Faktör Alfa Geni
SDS	Sodium dodecyl sulfate
UV	Ultraviyole

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İmmün (bağışıklık) sistemimiz, vücudumuzu zararlı maddelere karşı koruyarak yaşamımızı sürdürmemizde önemli rol oynamaktadır. Bağışık yanıt, bir biyolojik olay olarak, konağın kendisine yabancı olan maddeyi tanıması ve buna karşı yanıt vermesidir. İmmün sistemimizin en önemli özelliği, kendi antijenlerini ve kendinden olmayan antijenleri ayırt edebilmesidir¹. Fakat, otoimmün hastalıklarda bu görevini tam olarak gerçekleştirememektedir.

Bağışıklık sistemi ve merkezi sinir sistemi arasında hormonlar, peptidler ve nörotransmitterler aracılığı ile doğrudan bir etkileşim vardır. Ruhsal sistemin ve majör depresyonun bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklara olan etkileri birçok çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmalardaki ortak görüş, stres ve depresyonun bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etki gösterdiği yönündedir. Bağışıklık sisteminde ortaya çıkan değişikliklerin, stresin akut ya da kronik oluşuna göre farklılık gösterebileceği bildirilmektedir. Bu tip hastalıkların patofizyolojisinde sinyal moleküllerinin (bağışıklık sistemine ait iletili maddeler) katkısı olduğu da düşünülmektedir. Her iki sistemin hücrelerinin tetiklenmesi, bu hücrelerden bazı sinyal moleküllerinin salınımı ile sonuçlanır. Bunların başlıcaları; Tümör Nekroz Faktör (TNF), İnterlökin (IL) ve İnterferon (IFN) gibi sitokinlerdir². Çalışmamızda TNF- α , immün sistemin temel görevi olan kendinden olanın ve olmayanın ayırt edilmesinde ve herhangi bir antijenik uyarıya verilecek bağışık cevabının şiddetinin ayarlanmasında birinci derecede sorumlu olan MHC (Major Doku Uygunluk Kompleksi) lokusunun Sınıf III antijenlerinden olan TNF- α geni hedef olarak seçilmiştir. Özellikle genin ifade edilmesinde, tüm diğer yapısal genlerde olduğu gibi promotör dizilerindeki polimorfizmlerin önemli olması nedeniyle obsesif kompulsif bozukluk (OKB) ve PANDAS konusunda yapılan önceki çalışmalar da göz önünde bulundurularak TNF- α promotör bölgesindeki 308 ve 850 polimorfizmleri seçilmiştir. Moleküler olarak TNF- α 308 ve 850 polimorfizmleri ile PANDAS hastalığına genetik yatkınlık arasındaki ilişkinin araştırılması çalışmanın esas amacıdır.

2.GENEL BİLGİ

Psikiyatride enfeksiyonların rolüne ilişkin araştırma ve bulgular yeni değildir. Bu yüzyılın başında sifiliz (frengi) hastalığı, farklı ve yaygın psikiyatrik bozukluklara (Örn; Paralizi jeneral: Frenginin üçüncü evresidir. Frengi etkeninin, beyin ve sinir sistemini enfekte etmesi ile meydana gelir) yol açan bir enfeksiyon hastalığı idi. Gram-negatif spiroket bir bakteri olan *Treponema pallidum*'un sifilizin etkeni olarak bulunması ve penisilin ile tedavisinin gerçekleştirilmesi, psikiyatrik durumlarda enfeksiyonların rolü olabileceğini düşündürmüştü ve psikiyatrik bozuklukları anlamamızda enfeksiyon hastalıklarının bir model olabileceği fikrini doğurmuştur.

Yaklaşık iki yüzyıl önce Thomas Sydenham tarafından ortaya konmuş streptokok enfeksiyonu kaynaklı bir hastalık olan romatizmal ateş varyantı Sydenham Koresi için de aynı durum söz konusudur³. Obsesif-kompulsif bozukluk, romatizmal ateş, Sydenham Koresi gibi hastalıklar, streptokok bakterilerinin neden olduğu hastalıklardır. Streptokok bakterileri beta hemolitik streptokoklar, alfa hemolitik streptokoklar ve gama hemolitik streptokoklar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar⁴. Beta hemolitik streptokok bakterilerinin A, B, C ve G gibi grupları vardır. Bu gruplardan C ve G grupları boğazda ağrı nedeni olabilirler ancak komplikasyon yapmazlar. Hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen beta hemolitik streptokokların %85-90'ı A grubudur. En sık görülen grup A streptokok enfeksiyonları ise farenjit ve tonsillittir⁵.

Daha önceleri psikolojik kökenli bir bozukluk olarak dikkate alınan çocukluk çağı başlangıçlı obsesif-kompulsif bozukluğun günümüzde genetik duyarlılık, nörofizyolojik anormallikler ve beyinde bölgesel işlev bozukluğu dahil olmak üzere çeşitli etmenlerin rol oynadığı nörobiyolojik bir bozukluk olduğu düşünülmektedir. Giderek artan veriler, streptokok enfeksiyonları sonrası gelişen oto-immünitinin diğer bir etyolojik etmen olduğuna işaret etmektedir. Bu yaklaşım, birbirine paralel iki dizi araştırma tarafından desteklenmektedir. İlki, akut romatizmal ateşin geç komplikasyonu olan Sydenham Koresi, ikincisi ise çocukluk çağı obsesif-kompulsif bozukluğu ile Tourette sendromuna ilişkin araştırmalardır. Swedo ve arkadaşları Sydenham Koresinin;

obsesif-kompulsif bozukluğun bazı formları için tıbbi bir model olabileceğini iddia ederek bu hipotezi geliştirmişlerdir⁶.

1980'li yılların sonlarına doğru Uluslararası Akıl Sağlığı Enstitüsü'nün yaptığı açıklamaya göre Sydenham kore'li hastalarda obsesif kompulsif belirtilerde artış meydana gelmiştir. Streptokok enfeksiyonu sonucu ani başlangıçlı OKB belirtileri gösteren fakat, kore gözlenmeyen alt tip, PANDAS olarak adlandırılmıştır⁷. PANDAS'lı çocuklarda A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu tonsillofarenjitini takiben günler-haftalar içerisinde şiddetli obsesif kompulsif bozukluk ve tik atakları gelişmektedir⁸. PANDAS ile ilgili izlem çalışmalarında, PANDAS alt grubuna dahil olduğu düşünülen çocuklarda, semptom alevlenmeleri ile antistreptokokal titreler arasında belirgin pozitif koreleasyon bulunmuştur^{9,10}. Ayrıca Sydenham Koresi, Huntington Koresi, Globus Pallidus'un Bilateral Nekrozu gibi hastalıklarda obsesif-kompulsif bozukluk (OKB) belirtileri kliniğin bir parçası olarak karşımıza çıkmaktadır. 1990'lı yıllarda A grubu beta hemolitik streptokok (AGBHS) enfeksiyonuyla bir grup çocukta ani başlangıçlı ve epizodik seyirli OKB ve/veya tik bozukluğu arasında bir ilişki olabileceği bildirilmiştir¹¹. OKB hastalarının çok büyük bir kısmında nörolojik bulguların bulunması ve bazı ağır nörolojik hastalıklarda OKB belirtilerinin ortaya çıkması, araştırmaların OKB'un nöroanatomisine yönelmesine yol açmıştır. Obsesif-kompulsif bozukluk, çocukluk çağında başlayabilen ve oldukça ağır seyredebilen bir psikiyatrik bozukluktur. Yineleyen ve kişinin yaşamında belirgin sıkıntıya yol açan obsesyonlar ve kompulsiyonlarla karakterizedir. Günümüzde OKB'un çocuklukta ve erişkinlikte benzer belirtilerle ortaya çıktıkları ve olguların yarısına yakınının çocuk-ergen döneminde başladığı anlaşılmıştır. Obsesyonlar ve kompulsiyonlar bireyin yaşantısını zorlaştırarak sıkıntıya sokmaktadır. Obsesyon, kimi zaman istenmeden gelen veya uygunsuz olarak yaşanan, belirgin sıkıntıya neden olan ve başka bir düşünce ya da eylemle etkisizleştirmeye çalışılan yineleyici ve ısrarlı her türlü düşünce, dürtü veya takıntı olarak tanımlanmaktadır. Kompulsiyonlar ise kişinin obsesyona bir tepki olarak ya da katı bir biçimde uygulanması gereken kurallarına göre yapmaktan kendini alıkoyamadığı yineleyici davranışlar ya da zihinsel eylemlerdir. PANDAS, (Streptokok enfeksiyonlarına bağlı gelişen pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik hastalık) nöropsikiyatride yeni tanımlanan bir hastalıktır. Sık üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren ve genetik yatkınlık gösteren 4-12 yaş arası çocuklarda nörolojik bozukluklarla

karakterize olarak meydana gelmektedir. Nöropsikiyatrik belirtiler bazal gangliyon nöronlarının oto-antikorlar tarafından tahrip edilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır¹².

Obsesif-kompulsif bozukluğu olan hastalara beyin görüntüleme tekniklerinden SPECT (Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi) uygulandığında, görüntülenen beyin kesitlerinde normal beyin yapısına kıyasla farklılıklar gözlemlenmektedir.(SPECT; beyin iyi çalışan, fazla ve az çalışan alanlarını değerlendirilmesine olanak sağlayan ve beyindeki kan akımını ölçmeye yönelik kullanılan bir tip prosedürdür).

Obsesif-kompulsif bozukluğu olan hastalarda bu yöntemle özellikle birbiriyle bağlantılı beyin bölgelerinden; bazal gangliyonlar, singulat girus ve talamusta aktivite artışı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra frontal lobda da aktivite azalması gözlemlenmiştir¹³.

2.1. PANDAS (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections)

PANDAS tüm dünyada yeni tanımlanan nöropsikiyatrik bir hastalıktır. İlk defa Swedo ve arkadaşları tarafından 1998 yılında tanımlanmıştır. Aslında 19. yy'ın başlarında Sör William Osler, Sydenham koreli hastalarla yaptığı ilk çalışmalarda hareket bozukluklarına rastlamış olup 1980'lere kadar bu durumun beyinin bazal gangliyon bölgesiyle ilişkili olduğu belirlenmemiştir¹⁴.

1998 yılında Amerikan Ulusal Ruh Sağlığı Enstitüsü'ne göre oluşturulan PANDAS hastalığının kriterleri:

1. Obsesif-kompulsif bozukluk veya tik bozukluğunun görülmesi
2. Semptomların 3 yaş ile ergenlik arasında görülmesi
3. Ani semptom alevlenmelerinin görülmesi
4. Semptomların başlamasının ve alevlenmesinin A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu ile ilişkili olması
5. Semptom alevlenmelerinde nörolojik anormalliklerin olması¹⁵.

Türk toplumu genel olarak streptokok enfeksiyonlarına sık yakalanan bir toplumdur. Bu yüzden PANDAS'a en sık rastlanan toplumlardan birisidir. PANDAS hastalığının oluşmasında bireyin immün sisteminin duyarlı olması önemli rol oynamaktadır. Genetik ve immünolojik faktörler hastalığın etiolojisinde önem

taşımaktadır⁸. 2006 yılında Amerika’da yapılan bir araştırmaya göre; mevsimlerin de streptokok enfeksiyonunun meydana gelmesinde rol oynadığı ortaya çıkartılmıştır. Sonbaharda streptokok enfeksiyonu görülme sıklığı, ilkbahar/yaz mevsimlerine göre daha fazladır. Ayrıca, streptokok enfeksiyonu tekrar eden çocuklarda belirtilerin görülme sıklığı da artmaktadır¹⁶.

PANDAS, A grubu Beta Hemolitik Streptokok enfeksiyonu sonrasında beyin bazal gangliyon bölgesinde nöronların oto-antikorlar tarafından tahribatı ile obsesif-kompulsif belirtiler ve tik bozuklukları belirtileri ile meydana gelmektedir¹⁷. Streptokoklara bağlı obsesif-kompulsif hastalığın patofizyolojisi Sydenham Koresine çok benzer. Sydenham Koresinde A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonuna bağlı antistreptokokkal antikorlar, enfeksiyon sonucu kan beyin bariyerini geçen streptokok antijenlerinin bazal gangliyonda bulunan bazı epitoplara karşı moleküler mimikri sonucu çapraz reaksiyon vererek bağlanır. Benzer bir mekanizmanın PANDAS’da rol oynadığı düşünülmektedir¹⁸.

2.2. Nöronların apoptozu ve Tümör Nekroz Faktörün İmmün Cevaptaki Rolü

Tümör Nekroz Faktör (TNF), programlı hücre ölümünü tetikleyen polipeptid büyüme faktörüdür. İmmün cevabın ve hematopoiezis olarak tanımlanan kan hücrelerinin yapımlarının düzenlenmesine yardımcı olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından üretilen bir sitokindir. Bunun yanı sıra lenfoid hücreler, mast hücreleri, endotelial hücreler, kalp miyositleri, fibroblastlar ve sinir doku tarafından da sentezlenmektedir. Tümör nekroz faktör ailesine ait olan polipeptidlere ölüm aktivatörleri de denmektedir ve değişik hücre tiplerinde apoptoz sinyali veren TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanarak apoptoz mekanizmasını aktifleştirirler. Tümör nekroz faktörü, enfeksiyona karşı konak organizmanın savunma mekanizması tarafından hızlı bir şekilde üretilir, fakat aşırı eksprese olması ölümcül olabilmektedir.

TNF, ilk önce 212 aminoasitlik uzun bir stabil homotrimer şeklinde Tip-II transmembran proteini olarak sentezlenir. Bu transmembran protein, proteolitik yıkım enzimi olan metalloproteaz ile çözünebilir forma dönüştürülür ve salgılanır. TNF- α ’nın çözünebilir formu ilk defa 1975 yılında keşfedilmiştir¹⁹.

Tümör nekroz faktörün, TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki tipi vardır. TNF- α , immün cevabın ve hematopoiezis olarak tanımlanan kan hücrelerinin yapımının

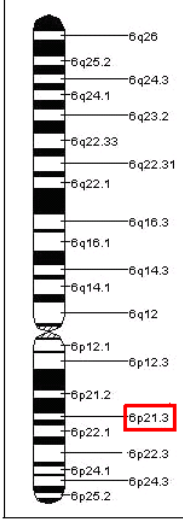
düzenlenmesine yardımcı olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından üretilen, birçok inflamatuvar ve immün sistem aracılı cevapta önemli rol oynayan bir sitokindir. Kaşektin olarak da adlandırılır. Monositler, makrofajlar, T ve B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK) ve endotoksin veya mikrobiyal ürünlerle uyarılan diğer hücrelerden salınır. TNF- β , lenfotoksin olarak adlandırılır ve aktive olmuş T-yardımcı hücreleri (Th) tarafından salgılanır²⁰. Çeşitli sitokinleri ortama salarak immün sistemi düzenleyen T-yardımcı hücreleri, salgıladıkları bu sitokinlerin türüne göre, farklı alt gruplara ayrılırlar. Th-1 hücreler, TNF- α , IL-2 ve IFN- γ üreterek çeşitli hastalıklara karşı immün savunmada önemli olan, hücrel immün cevabı uyarırlar. Th-2 hücreler ise; IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerini üretir ve alerjik tepkilerde rol oynarlar²¹. IL-1, IL-6 ve TNF gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtın ortaya çıkmasında rol oynarlar²².

2.3. TNF- α

Tümör Nekroz Faktör ailesine ait polipeptidler, immün sistemde apoptozu uyararak reseptörleri aktive ederek apoptozu gerçekleştirmektedir. TNF- α , bağışık cevabı oluşturacak sitokin kaskadının indüksiyonu için gereklidir. TNF- α , ayrıca, inflamasyonda, yara iyileşmesinde ve doku onarımında da görev alır. TNF molekülünün, bu etkilerine aracılık eden 2 reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; 55kDa molekül ağırlığındaki Tip I (CD_{120a}) ve 75kDa molekül ağırlığındaki Tip II (CD_{120b}) reseptörleridir. Tip II reseptörün TNF- α bağlama afinitesi, Tip I reseptörden 10 kat fazladır. Tip I reseptör, sitotoksik aktivite ve endotoksik şoktan sorumluyken, Tip II reseptör lenfosit proliferasyonunu yönlendirmektedir²³.

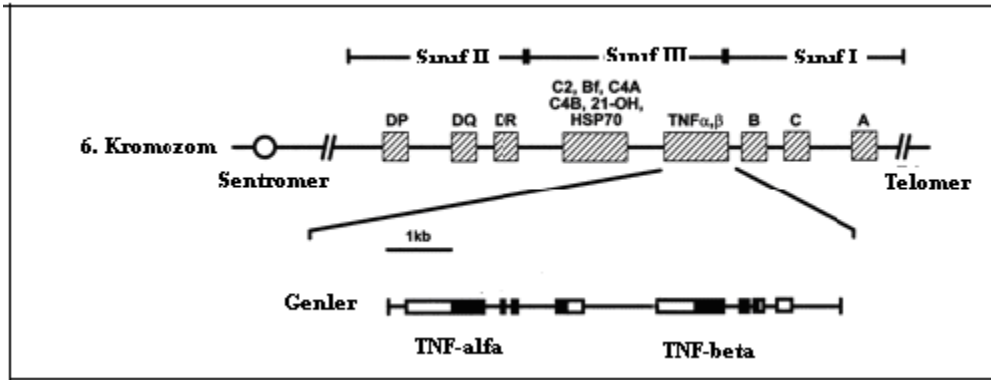
2.3.1. TNF- α Geni

İnsanda TNF geni, 6. kromozomda MHC lokusunda 6p21.3 bölgesinde yerleşmiştir²⁴.



Şekil 1. 6. kromozom ve MHC lokusu (6p21.3)²⁵.

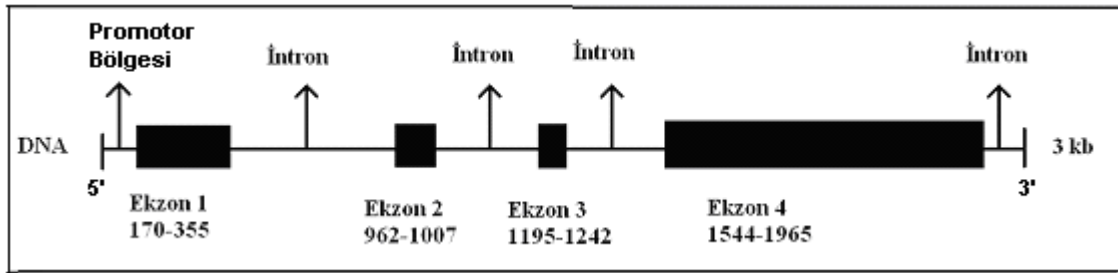
6. kromozom yaklaşık olarak 170 milyon baz çiftinden oluşur. Bu kromozom, toplam hücre DNA'sının % 5,5-6'sına sahiptir. Bugüne kadar 1,557 geni ve 633 psödogeni tanımlanmıştır. HLA-B, insan genomunda ve 6. kromozomdaki en polimorfik genlerdir²⁶.



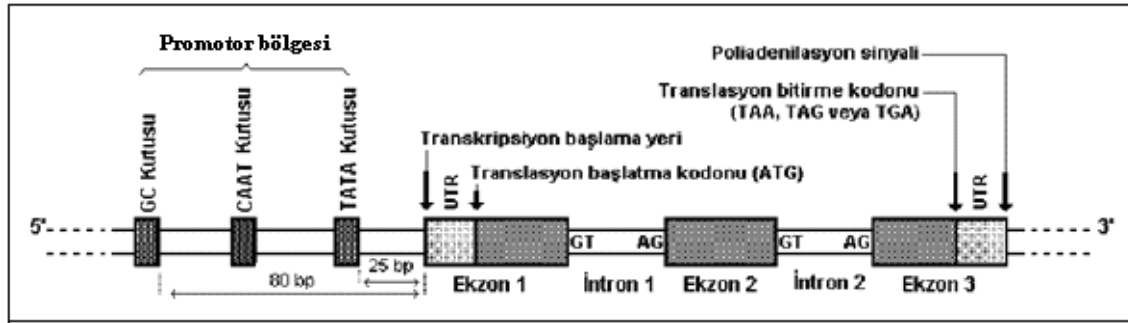
Şekil 2. TNF- α geninin 6. kromozom üzerindeki lokalizasyonu²⁷

İnsana ait TNF- α geni ilk defa 1985 yılında klonlanmıştır. Bu gen 6. kromozomun kısa kolunda Sınıf III MHC gen bölgesinde lokalize olmuştur. 3 kb uzunluğundadır ve 4 ekzonu vardır. TNF- α geni baz dizisinde 170-355, 962-1007,

1195-1242, 1544-1965 arasındaki bölgeleri oluşturan diziler ekzonları meydana getirmektedir. Bu bölgelerin haricindeki diziler ise intronları meydana getirmektedir. Üretilen proteinin %80'inden fazlasını 1. ekzon ve son ekzon kodlamaktadır. TNF- α geninin kodlanmayan bölgeleri promotor bölgesi ile 3' ve 5' UTR bölgeleridir.(UTR=Un Translated Regions. Proteine dönüşmeyen, genin transkripsiyonunda ve transkripsiyonel faktörlerin bağlanmasında etkili olan bölgelerdir). Olgun TNF molekülü, 17.356 Da ağırlığında olup, 157 aminoasitten oluşmuştur²⁸.



Şekil 3. TNF- α geninin intron ve ekzonları



Şekil 4. Gen yapısı²⁹

2.3.2. Ökaryot genlerinde promotor bölgeleri

Ökaryotlarda promotor bölgeleri, transkripsiyonu başlatmak için gerekli faktörlerin bağlandığı bölgelerdir. Bu bölgeler, RNA Polimeraz II tarafından tanınan ve genin yukarısında (5'yönünde) yer alan 100 bp'lik kısa modüler DNA dizileridir. Prokaryotik ve ökaryotik mRNA'ların 5' ve 3' uçlarında UTR bölgeleri adı verilen ve

transle olmayan bölgeler de bulunmaktadır. TNF- α üretimi transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel kontrol altındadır.

TNF- α geninin kodlanmayan bölgeleri promotor bölgesi ile 3' UTR bölgesidir. Kodlanan bölgeleri ise ekzon bölgeleridir. Olgun TNF molekülü, 17.356 Da ağırlığında olup, 157 aminoasitten oluşmuştur. Günümüzde gen ifadesinde rolü olduğu saptanmış olan önemli TNF polimorfizmleri bulunmaktadır. Bunlar;

1- (CT)_n sekansları:

*TNF b (7 allel)

*TNF c (2 allel)

*TNF d (7 allel)

*TNF e (3 allel)

2- (CA)_n sekansları:

*TNF a (12 allel)

3- Promotor bölge polimorfizmleri:

*-238 G/A değişimi (TNFA) Het/Homozigot

*-244 G/A değişimi

*-308 G/A değişimi (TNF1-2) Het/Homozigot

*-376 G/A değişimi

4- Diğer nadir polimorfizmler:

*- 49 G/A değişimi

*-419 G/C inversiyonu

* LT α +250 G/A değişimi (TNFB1-B2)

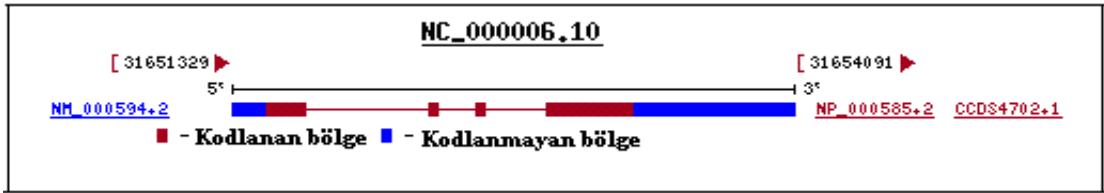
*-1031, -863, -857'de polimorfizmler tanımlanmıştır.

Bunlar arasında LT α (Lenfotoksin- α) +250 ve TNF- α -308 polimorfizmleri, bazal ve uyarılmış olarak artmış TNF- α üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle pek çok enflamatuar ve enfeksiyöz hastalığa yatkınlık ile bu polimorfizmler arasında ilişki kurulmaktadır²³.

2.3.3. TNF- α Gen Ekspresyonu

TNF- α geninin ekspresyonunun post-transkripsiyonel kontrolü; translasyonun başlaması, mRNA stabilitesi ve poliadenilasyon olayları ile düzenlenmektedir. TNF- α transkriptlerinin 3' UTR bölgesindeki AREs (AU Rich Elements=Adenin Urasil

bakımından zengin elementler=Sınıf I ARE'ler AUUUA, Sınıf II ARE'ler ise AUUUAUUUA tekrar dizilerine sahiptir) post-transkripsiyonel kontrolde önemli bir rol oynamaktadır. AU elementlerinin konsantrasyonu genin ne kadar sürede transkript vereceği bilgisini taşımaktadır. ARE'ye bağlanan trans etkili faktörlerin post-transkripsiyonel kontrolde rolü olduğu ortaya çıkartılmıştır. ARE bağlayıcı proteinlerin protein ekspresyonunun düzeyinin belirlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir. Çözülebilir 51 kDa'luk homotrimerik TNF, nanomolar konsantrasyon düzeylerinin altında biyoaktivitesini kaybeder³⁰.



Şekil 5. TNF- α gen yapısı³¹

Tablo 1. TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi³².

```

1  ggggaagcaa  aggagaagct  gagaagatga  aggaaaagtc  agggctctgga  ggggcggggg
61  tcaggagact  cctgggagat  atggccacat  gtagcggctc  tgaggaatgg  gttacaggag
121 acctctgggg  agatgtgacc  acagcaatgg  gtaggagaat  gtccagggct  atggaagtgcg
181 agtatcgggg  acccccctt  aacgaagaca  gggccatgta  gagggcccca  gggagtgaaa
241 gagcctccag  gacctccagg  tatggaatac  aggggacgtt  taagaagata  tggccacaca
301 ctggggccct  gagaagtgag  agcttcatga  aaaaaatcag  ggaccccaga  gttccttgga
361 agccaagact  gaaaccagca  ttatgagtct  ccgggtcaga  atgaaagaag  aaggcctgcc
421 ccagtggctc  gtgaattccc  gggggtgatt  tcactccccg  ggctgtccca  ggcttgtccc
481 tgctaccccc  acccagcctt  tcctgaggcc  tcaagctgcc  accaagcccc  cagctccttc
541 tccccgcaga  cccaaacaca  ggcctcagga  ctcaacacag  cttttccctc  caaccccggtt
601 ttctctccct  caaggactca  gctttctgaa  gccctccca  gttctagttc  tatctttttc
661 ctgcatcctg  tctggaagtt  agaaggaaac  agaccacaga  cctgggtccc  aaaagaaatg
721 gaggcaatag  gttttgaggg  gcatggggac  ggggttcagc  ctccagggtc  ctacacacaa
781 atcagtcagt  ggcccagaag  acccccctcg  gaatcggagc  agggaggatg  gggagtgtga
841 ggggtatcct  tgatgcttgt  gtgtcccaaa  ctttccaaat  ncccgccttc  gcgatggaga
901 agaaaccgag  acagaaggtg  cagggccac  taccgcttcc  tccagatgag  cttatgggtt
961 tctccaccaa  ggaagttttc  cgctggttga  atgattcttt  ccccgccctc  ctctcgcccc
1021 agggacatat  aaaggcagtt  gttggcacac  ccagccagca  gacgctccct  cagcaaggac
1081 agcagaggac  cagctaagag  ggagagaagc  aactgcagac  cccccctgaa  aacaaccctc
1141 agacgccaca  tcccctgaca  agctgccagg  caggttct

```

Sitokinlerle yapılan çalışmalarda, ilişkili genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP), birçok hastalıkla ilişkisi olduğu saptanmıştır. TNF- α geninin de promotor bölgesindeki polimorfizmler araştırılarak otoimmün hastalıkları ve diğer hastalıklarla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu

hastalıklardan PANDAS'ın oluş mekanizmasının aşağıdaki gibi olduğu önerilmektedir: Streptokok bakterilerinin ürettiği M antijenleri konak canlı organizmada, immün sistemde hümorale bağışıklıktan sorumlu B lenfosit ve hücresele bağışıklıktan sorumlu T lenfositlerini uyararak aktive ederler. M antijenleri, antijen sunumu yapan hücrelerle T lenfositlerine sunulurlar ve apoptoza yönlendirilirler. Duyarlı hale gelen bazı B ve T lenfositleri de aktive olarak santral sinir sistemine geçerler ve kan-beyin bariyerini aşarak bazal ganglia nöronlarının üzerinde bulunan reseptörlerle epitop benzerliğinden dolayı çapraz reaksiyon vererek birleşirler. Bu birleşme sonucunda da bir otoimmünite mekanizması olarak nöronlar apoptozla yok edilirler. Başka bir deyişle, bazal gangliyon nöronları oto-antikorlar tarafından tahrip edilmektedir. Nöron kayıpları zamanla sinapslarda iletişim bozukluğuna dolayısıyla da nöropsikiyatrik bozukluklara yol açmaktadır³³. Çocuklar, 12 yaş civarında M proteinine karşı antikorlar geliştirebildikleri için ergenlikten sonra A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu sıklığında bir azalma olmaktadır^{6,33}.

2.3.4. Bağışıklık sistemi ve elemanları

Bir canlının başka bir canlıda yaşamını sürdürmesi, bu esnada konakta zarar meydana getirmesi ve bu etkilere karşı konakta karşıt tepkimelerin oluşması sonucu meydana çıkan belirtiler kümesine enfeksiyon diyebiliriz. Mikroorganizmalara karşı oluşan bağışıklık iki kısımdan oluşur:

- 1) **Doğal bağışıklık:** Bu bağışıklık sistemi, mikroorganizmalara özgül olmayıp, kalıtsal olarak türsel ve bireysel yapı sonucu meydana gelmiş bir bağışıklık biçimidir.
- 2) **Sonradan kazanılan veya özgül bağışıklık:** Bu bağışıklık, enfeksiyon etkenlerinin veya bir antijenin konakçıyla temas etmesi sonucunda oluşan bağışık yanıtla ilgilidir. Bu bağışıklık özgüldür. Hümorale ve hücresele olmak üzere iki türlü bağışık yanıtta oluşur.

A) Hümorale Bağışıklık

Hümorale bağışık yanıt, kan ve vücut sıvılarında bulunan özgül immünoglobulin molekülleriyle ilgilidir. Hümorale bağışıklığın esas hücreleri B lenfositleridir. B lenfositleri CD₂₀ yüzey reseptörü taşırlar. CD₂₀, B hücre membranında bulunan hidrofobik karakterdeki çoklu domain yapısındaki bir transmembran reseptörüdür.

B) Hücresel Bağışıklık

Bu bağışıklık türü, antijeni özgül olarak tanıyan yardımcı T ve sitotoksik T hücreleriyle ilgilidir. Hücresel bağışıklığın esas hücreleri T hücreleridir. T hücre yüzey reseptörü olan CD₂, NK hücre membranında da bulunan hücre adezyon molekülüdür. Yardımcı T hücresi, sitotoksik T hücresi, süpresör T hücresi, efektör T hücresi ve hafıza T hücresi gibi alt gruplardan oluşur.

Yardımcı T hücresi: Spesifik antijenleri MHC- Sınıf II molekülleri ile sunulduğunda aktiflenen ve imün cevabın şiddetini ayarlayan bir T hücresi grubudur.

Sitotoksik T hücresi: Tümör veya virüs antijenlerin MHC– Sınıf I molekülleri ile birlikte sunumu yapıldığında, öldürücü fonksiyonu aktiflenerek hedef hücreyi ortadan kaldıran hücre grubudur. CD₈ yüzey reseptörü taşırlar.

Süpresör T hücresi: Spesifik antijenleri fark ederek direkt veya baskılayıcı faktörler aracılığıyla immün cevabın düzeyini belirleyen hücre grubudur.

Effektör T hücresi: Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonundan sorumlu hücre grubudur.

Hafıza T hücresi: İlk defa karşılaştığı antijenik özelliklere göre özelleşmiş T lenfosit klonlarının aynı antijen ile daha sonra karşılaştıklarında da onları tanıyabilme özelliğinde olan hücre grubudur.

NK hücreleri (Doğal öldürücü hücreler): Büyük granüllü lenfositlerdir. Tümör hücrelerine ve virüsle enfekte olmuş hücrelere karşı sitotoksik etki gösterirler. NK hücrelerinin belli bir antijen özgüllüğü ve MHC molekülüne bağlı tanıma özelliği yoktur.

B lenfositleri: B lenfositleri sentezledikleri Ig moleküllerini hücre zarı yüzeyinde taşıdıkları için, aynı zamanda antijene karşı özgül reseptör fonksiyonu da gösterirler. B lenfositlerinin çoğunda MHC sınıf II antijenleri vardır. Bu antijenler T lenfositleriyle etkileşimde önemlidir.

İnterlökinler: Lökositler arasında özel etkileşim yaratan sitokinlerdir.

İnterferonlar: İmmün cevabın baskılanmasını veya modülasyonunu sağlayan ve virusların büyümesiyle etkileşimde olan sitokinlerdir¹.

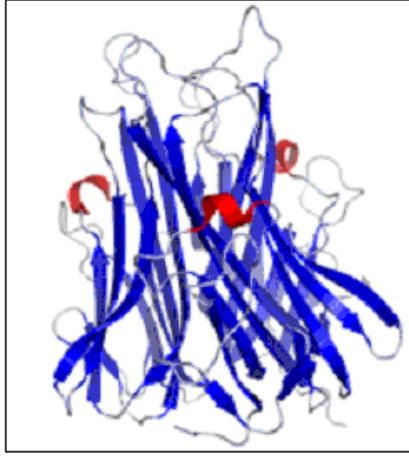
3. İnterlökin-TNF- α İlişkisi:

Vücuttaki tüm çekirdekli hücreler tarafından IL-1 üretilmektedir. İnsanda IL-1_a ve IL-1_b olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Bu iki form, farklı genler tarafından kodlanan 159 ve 153 aminoasitlik peptidlerdir. Birbirleri ile sadece %26 oranında benzer olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve potensleri identiktir. Yine aynı hücre yüzey reseptörlerine benzer afinitelerle bağlanırlar.

Birçok hücre tarafından biyolojik olarak inaktif olan, ancak reseptörlere bağlanma için IL-1 molekülleri ile yarışarak kompetitif inhibisyon yapan IL-1 reseptör antagonist (IL-1_{Ra}) olarak bilinen proteini kodlayan üçüncü bir gen eksprese edilmektedir.

IL-1, TNF ile beraber antijen sunan hücrelerce Th hücrelerin aktivasyonunu sağlar. Antijen ile temas eden antijen sunan hücreler tarafından salgılanan bu iki sitokin, birçok adezyon molekülünün ekspresyonunu artırır. IFN üretimi artar ve yüzeyde MHC Sınıf II moleküllerinin ekspresyonu artar. Böylece Th hücreler tarafından antijen sunan hücreler bağlanabilir ve aktive olabilir. Aktive olan hücrelerde IL-2 salınımı ile IL-2 ve IFN reseptörlerinin ekspresyonu artar, sonuçta duyarlı Th hücrelerde klonal proliferasyon gerçekleşir. IL-1 ve TNF beraber hem humoral hem de hücrel immün cevabın ortaya çıkmasını sağlar. Nötrofil ve makrofajları stimüle eder, B hücre proliferasyonunu hızlandırır, hematopoiezisi stimüle eder, birçok sitokin ve inflamatuvar mediatörün etkilerine aracılık eder.

TNF- α , bakteriyel infeksiyonların hem in-vivo hem de in-vitro olarak kontrolünde önemli rol oynamaktadır. IFN-g ile beraber makrofajları aktive ederek, hücre içi parazitlerin gelişimini kontrol eder. Bu aktivasyon, reaktif oksijen ara ürünlerinin oluşumu ile ilişkilidir. Sitokin ile aktive olan makrofajlar in-vitro olarak oluşturdukları reaktif nitrojen ara ürünleri aracılığıyla da bakterilerin hücre içi öldürülmesini sağlarlar²³. Bağışıklık sistemi bir patojenle savaşırken, sitokinler, T hücresi ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerini sinyal verir ve enfeksiyon bölgesine gitmeleini sağlarlar. Uygulamada, sitokinler daha fazla sitokin üretmeleri için onları uyararak bu hücreleri etkinleştirirler.



Şekil 6. TNF alfanın kristal yapısı³⁴

4. TNF ve Apoptoz Mekanizması

PANDAS’da TNF ile ilişkili apoptoz mekanizması ile nöronlar yok edilmektedir. Tümör nekroz faktör ailesine ait olan polipeptidlere ölüm aktivatörleri de denmektedir ve değişik hücre tiplerinde apoptoz sinyali veren TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanarak apoptoz mekanizmasını aktifleştirirler. Hücre zarında bulunan bir çeşit integral membran protein yapısında olan Fas ve TNF- α reseptörleri, uygun ligandlar ile bağlandıklarında, sitoplazmada bulunan inaktif Prokaspaz-8’in aktifleşmesine neden olarak buldukları hücreyi ölüme götüren sinyal kaskadını başlatmış olurlar.

Bu mekanizma iki farklı yolla gerçekleşmektedir:

1) Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir ve sitotoksik T lenfositleri ile doğal öldürücü hücrelerin yüzeyinde bulunur. FasL’in N terminali sitoplazmadadır, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır.

FasL ve TNF, Fas ve TNFR1 reseptörleri ile bağlandıkları zaman ölüm uyarısını almış olarak bir seri protein-protein etkileşimlerinde bulunurlar. Fas-FasL bağımlı apoptozda FADD (Fas Associated Death Domain), Fas ile ilişkili; TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain), TNFR ile ilişkili ölüm bölgeleridir. Aktive olan apoptotik sinyal, FADD ve TRADD ölüm bölgelerine bağlanan Kaspaz-8’e iletilir. Kaspaz-8, ölüm sinyalinin iletiminde rol alan başlatıcı proteinazlardan biridir. Kaspaz-8’in aktive olması ile birlikte diğer proteinazlar kaskad halinde kendi kendine aktive olarak ölüm sinyalini nükleusa kadar iletirler ve sonuçta kromozomal DNA’nın yıkımına neden

olurlar. Fas-FasL bağımlı apoptoz mekanizması iki tarafı keskin kılıç gibidir. Bu sistem doğru regüle edildiği takdirde viral enfeksiyonların ve kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Sistemin yeterli çalışmaması, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılamamasına neden olurken fazla çalışması ise doku hasarına neden olur.

2) Sitotoksik T hücrelerinde meydana gelen uyarılma, perforin ve granzim içeren granüllerde sekresyona neden olur. Perforinin, hedef hücre plazma membranında porlar açtığı ve granzimin de buna yol gösterdiği düşünülmektedir. Fakat perforin/granzim ve FasL, hücre ölüm programını birbirinden bağımsız olarak tetiklemektedir. Sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri, perforin/granzim ve Fas/FasL yolunun her ikisini de kullanırlar ancak ne zaman hangisini tercih ettikleri bilinmemektedir¹.

5. HLA (MHC=İNSAN LÖKOSİT ANTİJENİ)

İmmunolojik ve nonimmunolojik fonksiyonu olan bir dizi genden oluşan MHC bölgesi ilk kez farelerdeki transplantasyon çalışmaları ile Peter Gorer tarafından 1937 yılında tanımlanmıştır. Bu genlerin ürünleri olan moleküller, 1958 yılında Jean Dausset tarafından (HLA-A2) tanımlanmış, aynı yıl Van Rood ve arkadaşları HLA-BW4 ve BW6 antijenlerini ve kan transfüzyonu yapılmış kişilerin ve çok doğum yapmış kadınların serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikorları göstermişlerdir.

İlk doku antijenleri lökositlerde saptandığı için insan lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigens = HLA) olarak tanımlanmışlardır. Daha sonraki yıllarda eritrositlerin dışında bütün vücut hücrelerinde buldukları ve çok önemli oldukları anlaşılınca bu grup antijen sistemi MHC molekülleri veya MHC antijenleri olarak ta isimlendirilmiştir. MHC genel bir isimdir ve her bir türün ayrı bir MHC simgesi vardır³⁵.

5.1. İmmün Tanıma

İmmün yanıtın oluşumunda ilk basamak, kendi HLA molekülünce sunulan yabancı peptidin yardımcı T hücreleri tarafından (CD₄ T hücreleri) tanınmasıdır. Tanınmanın sağlanabilmesi için T-hücre reseptörü (THR), HLA-antijen kompleksine özgü olmalıdır. Hücrelerin birbiriyle teması üzerine THR, yabancı peptid ve antijen sunan hücre üzerinde yer alan MHC molekülünden oluşan trimoleküler bir kompleks meydana gelir. T hücreleri ve antijen sunan hücre arasındaki etkileşim, diğer lenfositler ve B₇, CD₄₀ gibi T hücreleri üzerinde yer alan CD₄, CD₈, CD₂₈ ve CD_{11a}/CD₁₈ gibi APC hücre yüzey molekülleri (lökosit fonksiyonuyla bağlantılı antijen 1 [LFA-1] ve interselüler adhezyon molekülü (ICAM-1) desteği ile sağlanır. Hücre yüzey reseptörleri ve sitokinler gibi immün modülatör molekülleri kodlayan genler uyarılır, transkribe edilir ve aktif ürünler vermek üzere translyasyon geçirirler. Aktivasyonun erken evrelerinde yanıtlayıcı T hücrelerinin klonal genişlemesi ile sonuçlanan, interlökin 2 (IL-2) ve interferon (IFN) sitokinleri üretilir. Makrofajlar ve B hücreleri de ek sitokinler ve kemokinler katılarak çalıştırılmıştır ve böylelikle uyarılmış B hücrelerinin yanıtı genişletilerek olgun antikor oluşturan plazma hücrelerine dönüşmeleri sağlanır. İmmün yanıtın hem hücresel hem de hümorale kolları, nakledilen bir organın yabancı HLA antijenleri ile ilişki halindedir^{36,37}.

6. PANDAS'da Tedavi

PANDAS'da ilaç tedavisine ilişkin ilk veriler başlangıçta olgu bildirimlerine dayanmaktadır. Otoimmün süreci tamamen baskılayan ya da kesintiye uğratan intravenöz immunglobulin, prednizon, penisilin gibi ilaçların kullanılması ve plazma değiştirilmesi (plazmaferez) gibi uygulamalar PANDAS tanılı çocuklarda akut ve belirgin bir düzelme oluşturmaktadır. Özellikle 3 yıl süreyle 3 haftada bir uygulanan penisilin iğnesi, tedavi açısından çok olumlu sonuçlar vermektedir. Üçüncü yılın sonunda kesin pozitif sonuç alınmaktadır. Eğer uygun şekilde tedavi edilmezse belirli bir zaman sonra şizofreniye kadar gidebilen geri dönüşümsüz nörolojik bozukluklar ortaya çıkabilmektedir⁶.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmaya; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı yetkili doktorları tarafından PANDAS tanısı konulan 58 hasta çocuk ile 58 sağlıklı çocuk dahil edildi. Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan 3-4 cc kanlar +4 °C' de muhafaza edilip, DNA izolasyonu için kullanıldı. PCR amplifikasyonları ve kesim reaksiyonları yapıldıktan sonra PAGE (Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ile görüntülendi.

3.2. Gereç

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. Tag polimeraz (Fermantas)
2. Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Merck)
3. Sukroz (Merck)
4. Tris baz (Amresco)
5. Sodyum klorür (NaCl) (Fermantas)
6. EDTA (Sigma)
7. Sodyum dedosil sülfat (SDS) (Bio Basic Inc)
8. Proteinaz K (Sigma)
9. Brom fenol mavisi (Fermantas)
10. Etidyum bromür (Fermantas)
11. PCR tamponu (Fermantas)
12. Hae III ile kesilmiş pUC marker DNA (Fermantas)
13. Primerler
14. Deoksinükleosit Trifosfat seti (Roche)
15. Agaroz (promega)
16. Saf etanol (Riedel-de Haen)
17. DNA izolasyonu, PCR ve elektrofrez ile ilgili diğer kimyasal maddeler (Sigma ve Merck)
18. Restriksiyon enzimleri

3.3. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Santrifüjler (Techne Cambridge, Universal 16R)
2. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160)
3. Hassas terazi (Sartorius)
4. Su banyoları (Grant)
5. pHmetre (Inolab)
6. Derin dondurucu (-20 °C) (Beko)
7. Buzdolabı (+4 °C) (Uğur)
8. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
9. Yatay elektroforez tankı (Biogen)
10. Dikey elektroforez tankı (Biolab)
11. Deepfreez (Beko, Siemens)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Mikrodalga fırın (Arçelik)
14. Elektroforez cihazı (EC 3000-90, E-C Apparatus Corporation)
15. Thermal cycler (Bioer XP cycler, Eppendorf Mastercycler)
16. Otoklav (Trans)
17. Otomatik pipetler (Socorex, Beta-Pette, Gilson, Rainin)
18. Mezür
19. Etil alkol
20. Primerler
21. pHmetre
22. Steril kabin (Kojair KR-125 Safety)
23. Eppendorf tüpler

Bu teknik malzemeler araştırmanın yapıldığı Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı moleküler biyoloji laboratuvarında bulunmaktadır.

3.4. Yöntem

Bu çalışmada, öncelikle hastalardan toplanan kan örnekleri numaralandırılıp listelendi ve +4 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra, bu örneklerin doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı^{38,39}. PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi ve agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi. PCR ürünleri parça uzunluk kesim polimorfizmi (RFLP) reaksiyonuna tabi tutularak poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel üzerindeki

bantlara göre polimorfizm olup olmadığı belirlendi. Elde edilen sonuçların istatistiksel verileri SPSS 10.0 programında tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler metodu ile varyans analizi ve ikili karşılaştırma metodlarıyla belirlenmiştir.

3.4.1. DNA İzolasyonu

3.4.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi

- 1- Bench temizliği yapıldı (%70'lik alkol ile)
- 2- Benmari açıldı (65 °C).
- 3- Eppendorf tüplere 700 µl kan ve 700 µl eritrozis lizis tamponu konuldu. 2-3 dk oda ısısında bırakıldı.
- 4- 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 5- Süpernatant atıldı. Sonra, 700 µl lizis tamponu pellete eklendi, karıştırıldı ve çözüldü.
- 6- 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 7- Süpernatant atıldı. 1000 µl fizyolojik tampon konuldu ve karıştırıldı.
- 8- 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 9- Süpernatant atıldı. 1000 µl fizyolojik tampon konuldu ve karıştırıldı.
- 10- 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 11- 300 µl TE-9
20 µl PK
100 µl SDS ilave edildi, karıştırıldı ve pellet çözdürüldü.
- 12- 65 °C'ye ayarlanmış benmari'ye konuldu ve 1-1.30 saat beklenildi.
- 13- 6 M Tuz çözeltisinden 200 µl ilave edildi ve karıştırıldı.
- 14- 13.500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
- 15- Süpernatant yeni steril tüpe alındı ve pellet atıldı.
- 16- 13.500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
- 17- Süpernatant yeni steril tüpe alındı ve pellet atıldı.
- 18- %100'lük etil alkolden 900 µl konuldu.
- 19- 13.500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
- 20- Süpernatant atıldı. %70'lik etil alkolden 1000 µl konuldu.
- 21- 13.500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.
- 22- Süpernatant atıldı. Tüpler ters çevrilip oda sıcaklığında 20-25 dk DNA'nın tüpe yapışması beklendi.
- 23- 200 µl TE konuldu.
- 24- 65 °C'ye ayarlanmış benmari'de 15 dk bekletildi ve DNA'nın çözülmesi sağlandı.

25- Bir gece oda ısısında dinlenmeye bırakıldı.

3.4.2. TNF- α Geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu

3.4.2.1. TNF- α Geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri İçin Kullanılan Primer Dizileri

Çalışmamızda; TNF- α geninin promotor bölgesindeki -308 G/A ve -850 C/T polimorfizmleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. -308 G/A ve -850 C/T polimorfizmlerinin tespiti için gerekli primer dizileri, daha önce yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Baz dizileri üzerinde primerleri belirlemeye yarayan özel bir programda (Gene runner) promotor bölgesi baz dizisi ile primerlerimizi eşleştirerek primerlerin doğruluğunu tekrarlamış olduk.

Çizelge 1. -308 G/A ve -850 C/T PCR-RFLP primerleri

TNF-α Geni -308 G/A Polimorfizmini Belirlemek İçin Kullanılan Primer Çifti
Forward primer : 5'-GGG ACA CAC AAG CAT CAA GG-3'
Reverse primer : 5'-AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG-3'
TNF-α Geni -850 C/T Polimorfizmini Belirlemek İçin Kullanılan Primer Çifti
Forward primer: 5'-AAG TCG AGT ATG GGG ACC CCC CGT TAA-3'
Reverse primer : 5'-CCC CAG TGT GTG GCC ATA TCT TCT T-3'

Tablo 2. TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi. Mavi boyalı ve altı çizili bölgeler -308 G/A polimorfizmini belirlemek için kullanılan forward ve reverse primerlerin baz dizileri. Bu primerlerle 142 bp'lik bölge amplifiye edilmiştir.

```
1 ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg
61 tcagggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag
121 acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggct atggaagtgc
181 agtatcgggg accccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa
241 gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacgtt taagaagata tggccacaca
F 301 ctggggcggg acacacaagc atcaaggtga aaaaaatcag ggaccccaga gttccttggg
361 agccaagact gaaaccagca ttatgagtct cggggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc
R 421 ccagtggctc c atggccctca aaacctattt tcactccccg ggctgtccca ggcttgtccc
481 tgctaccccc acccagcctt tctgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc
541 tccccgcaga cccaacacaca ggccctcagga ctcaacacag cttttccctc caaccccttc
601 ttctctccct caaggactca gctttctgaa gcccctccca gttctagttc tatctttttc
661 ctgcatacctg tctggaagtt agaaggaaac agaccacaga cctgggtcccc aaaagaaaatg
721 gaggcaatag gttttgaggg gcatggggac ggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa
781 atcagtcagt ggcccagaag accccccctcg gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga
```

841 ggggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaaa ctttccaaat ncccgcccc gcgatggaga
 901 agaaaccgag acagaaggtg cagggcccac taccgcttcc tccagatgag cttatgggtt
 961 tctccaccaa ggaagttttc cgctgggtga atgattcttt ccccgccctc ctctcgcccc
 1021 agggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgctccct cagcaaggac
 1081 agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc
 1141 agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct

Tablo 3. TNF- α geni promotor bölgesi baz dizisi. Yeşil boyalı ve altıçizili bölgeler -850 C/T polimorfizmini belirlemek için kullanılan forward ve reverse primerlerin baz dizileri. Bu primerlerle 131 bç'lik bölge amplifiye edilmiştir.

1 ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggccccggg
 61 tcagggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag
 121 acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggct atggaagtccg
 181 agtatcgggg accccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa
 241 gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacggt taagaagata tggccacaca
 301 ctggggccct gagaagtgag agcttcatga aaaaaatcag ggaccccaga gttccttgga
 361 agccaagact gaaaccagca ttatgagtct ccgggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc
 421 ccagtgggtct gtgaattccc gggggtgatt tcaactcccc ggctgtccca ggctgtccc
 481 tgctaccccc acccagcctt tcttgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc
 541 tccccgcaga cccaaacaca ggctcagga ctcaacacag cttttccctc caaccocgtt
 601 ttctctccct caaggactca gctttctgaa gccctccca gttctagttc tatctttttc
 661 ctgcatcctg tctggaagtt agaaggaac agaccacaga cctgggtcccc aaaagaaatg
 721 gaggcaatag gttttgagg gcatggggac ggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa
 781 atcagtcagt ggcccagaag accccccctc gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga
F 841 ggggtatcca **agtcgagtat ggggacccc cgttaa**aaat ncccgcccc gcgatggaga
R 901 agaaaccgag acagaaggtg cagggcccac taccgcttcc tccagatgag cttat**aagaa**
 961 **gatatggcca cacactgggg** cgctgggtga atgattcttt ccccgccctc ctctcgcccc
 1021 agggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgctccct cagcaaggac
 1081 agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc
 1141 agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct

Kullandığımız bu primerleri seçerken, primerde bazların dengeli dağılmasına, primerin kendi içerisinde bağlanmaya neden olacak dizi bulunmamasına, Tm ısısının 70-75 °C olmasına ve kalıp DNA içinde yanlışlıkla tanıyacak baz dizisine sahip olmamasına dikkat edilmiştir³⁹.

3.4.2.2. TNF- α geninin -308 G/A ve -850 C/T Polimorfizmleri için Kullanılan PCR Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu aşamasında; final 25 μ l'lik PCR tüpü oluşturacak şekilde; 2,5 μ l 10X PCR tamponu, 2,5 μ l MgSO₄, 0.2 mmol/L dNTP'ler, her bir primerden 1 μ l, 0,25 μ l Tag polimeraz, 100 ng genomik DNA eklenerek hazırlanmıştır. 25 μ l'ye tamamlayacak kadar steril bidistile su eklendikten sonra uygun PCR programında amplifikasyon yapılmıştır. Çizelge 2'de -308 G/A polimorfizmi için, çizelge 3'de ise -850 C/T polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonları verilmiştir.

Çizelge 2. -308 G/A polimorfizmi için uygulanan PCR reaksiyon ısı döngüleri

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	1 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	40
Primer bağlanması	62	30 sn	
Zincir uzaması	72	15 sn	
Son uzama	72	1 saat	1

Çizelge 3. -850 C/T polimorfizmi için uygulanan PCR reaksiyon ısı döngüleri

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	3 dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	40
Primer bağlanması	68	30 sn	
Zincir uzaması	72	1 dk	
Son uzama	72	1 saat	1

Elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyon varlığı veya yokluğunun anlaşılabilmesi için agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Sonraki aşamada -308 G/A polimorfizmi için *Nco I* Restriksiyon enzimi kullanılarak, -850 C/T polimorfizmi için de *Hinc II* Restriksiyon enzimi kullanılarak kesim reaksiyonu yapılmıştır. Kesimi yapılan ürünler PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile görüntülenerek baz çifti uzunluklarına göre adlandırılmıştır. *Nco I* restriksiyon enzimi uygulandığında kesilmeyen 142 bp uzunluğundaki homozigot GG genotipli PCR ürünü TNF1, kesilerek 126 bp uzunluğunda bir bant veren AA genotipli PCR ürünü ise TNF2 olarak adlandırılmıştır. *HincII* enzimi uygulandığında kesilmeyen 131 bp uzunluğundaki PCR ürünü T alleli, kesilerek 106 bp uzunluğunda bir bant veren ürün ise C alleli olarak adlandırılmıştır.

3.4.3. % 2'lik Agaroz Jel Elektroforezi

- 1- 0.7 gr agaroz tartılarak 100 ml'lik erlenmayere konuldu ve 35 ml 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu eklendi.
- 2- Mikrodalga fırında 2 dakika kaynatıldı.
- 3- 3 µl ethidium bromid eklendi.
- 4- Elektroferez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1 mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
- 5- Soğuması beklenen agaroz jeli, jel kabına döküldü ve donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
- 6- Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroferez tankına yerleştirildi.
- 7- Jeldeki açılmış olan kuyucuklara 5 µl DNA marker (Puc18/Hae III) ile 5 µl yükleme tamponuyla karıştırılmış 5 µl PCR ürünlerinden 10'ar µl uygulandı.
- 8- Jele elektrik akımı verilerek 80 V, 100 A ve 80 Watta 1.5 saat elektrofereze tabi tutuldu.
- 9- Oluşan bantlar UV altında okunarak bir diskete kaydedildi.

3.4.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz enzimleri ile Kesimi

- 10 µl PCR ürünü
- 0.5 µl enzim
- 7.5 µl su
- 2 µl (10X) tampon
- Örnek sayısı ile çarpılarak mix hazırlandı
- Her bir ependorfa 10'ar µl mix ve PCR ürünü konuldu
- 37 C⁰ de 1 gec e bekletildi
- Kesimi durdurmak için her bir tüpe 4 µl boya eklendi
- PAGE ile görüntülendi.

NcoI ve *Hinc II* restriksiyon enzimlerinin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır:

Nco I Enzimi kesim bölgesi:

5' GT*AC 3'

Hinc II enzimi kesim bölgesi:

5' C*CATGG 3'

3.4.5. %10'luk Poliakrilamid Jeli Hazırlama

%40 Akrilamid stok	2 ml
Bidistile H ₂ O	5 ml
10X TBE	800 ml
%25'lik APS (Amonyum persülfat)	50 µl
TEMED	2 µl

1- İki cam arasına, arada 1 mm boşluk kalacak şekilde hazırlanan vertikal mini elektroforez jel dökme kabına yaklaşık 5 ml kadar jel konuldu ve tarak yerleştirilerek akrilamid polimerizasyonu (jelin katılaşması) için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.

2- Tarak çıkartıldı ve jel elektroforez tankına yer yerleştirilerek tarak dişlerinin açmış olduğu kuyucuklara 5'er µl miktarlarda Puc18/HaeIII marker'ı ile aynı miktardaki kesim ürünleri uygulandı.

3- 15 Volt /cm² olacak şekilde elektrik akımı verilerek 60 dk süreyle elektroforez yapıldı. Jel iki cam arasından çıkartılıp içinde 0.5 µg/ml ethidium bromid bulunan TBE tamponu içinde 15 dk bekletilerek DNA fragmanlarının boyanması sağlandı.

4- Bantlar UV altında okunarak görüntü diskete kaydedildi.

3.4.6. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Verilerimizin istatistiksel analizlerinde SPSS 10.0 programı kullanıldı. Parametreler, tekrarlı ölçümler (Repeated measures), varyans analizi ve ikili karşılaştırma (Pairwise comparisons) metodları ile analiz edildi. P<0,05 olan değerleri kapsayan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya aldığımız hasta ve kontrol gruplarının yaşları 4 ve 12 arasında değişmekte olup, hasta grubu 19 kız, 39 erkek toplam 58 birey ve kontrol grubu ise 32'si kız, 26'sı erkek olan 58 sağlıklı bireyden oluşmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Cinsiyetin hasta ve kontrol grupları içindeki dağılımı

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Erkek	39	26
Kız	19	32
Erkek (%)	%67,24	%44,82
Kız (%)	%32,75	%55,17

Çalışmamızda bulduğumuz hasta ve kontrol grubuna ait polimorfizmler Tablo 5'te verilmiştir. -308 G/A polimorfizmi için incelemeye aldığımız 58 hasta bireyden 53 tanesi polimorfik olarak kabul edilen AA genotipi şeklinde tespit edilmiş olup; 5 tanesi ise yine bir polimorfizm türü olan GA genotipi şeklindedir (Tablo 5).

-850 C/T polimorfizmi için incelemeye aldığımız 58 hasta bireyden 30 tanesi normal genotip olarak kabul edilen CC genotipinde olup, 16 tanesi polimorfik kabul edilen CT ve 12 tanesi de diğer bir polimorfizm olarak kabul edilen TT genotipindedir (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunun -308 G/A ve -850 C/T polimorfizm genotipleri (-308 G/A polimorfizmi için GG normal genotiptir. GA ve AA genotipleri ise polimorfik genotiplerdir. -850 C/T polimorfizmi için CC normal genotiptir. CT ve TT genotipleri ise polimorfik genotiplerdir).

Hasta	-308 G/A	-850 C/T		-308 G/A	-850 C/T
Hasta 1	AA	TT	Kontrol 1	GA	CC
Hasta 2	AA	CT	Kontrol 2	GG	CC
Hasta 3	AA	CT	Kontrol 3	GG	CT
Hasta 4	AA	CT	Kontrol 4	GG	CC
Hasta 5	AA	CT	Kontrol 5	GA	CC
Hasta 6	AA	CC	Kontrol 6	GG	CC
Hasta 7	AA	CT	Kontrol 7	GG	TT
Hasta 8	AA	CC	Kontrol 8	GG	TT
Hasta 9	AA	CC	Kontrol 9	GG	CC
Hasta 10	AA	CT	Kontrol 10	GG	CC

Hasta 11	AA	TT	Kontrol 11	GG	CC
Hasta 12	GA	TT	Kontrol 12	GG	CT
Hasta 13	AA	CC	Kontrol 13	GA	CC
Hasta 14	AA	CT	Kontrol 14	GG	CT
Hasta 15	AA	CC	Kontrol 15	GG	CC
Hasta 16	AA	CC	Kontrol 16	GG	CC
Hasta 17	AA	CC	Kontrol 17	GG	CT
Hasta 18	AA	CC	Kontrol 18	GG	CT
Hasta 19	GA	CC	Kontrol 19	GA	CC
Hasta 20	AA	TT	Kontrol 20	GG	TT
Hasta 21	AA	CC	Kontrol 21	GG	CC
Hasta 22	AA	CC	Kontrol 22	GA	TT
Hasta 23	GA	TT	Kontrol 23	GG	CC
Hasta 24	AA	TT	Kontrol 24	GG	CT
Hasta 25	AA	CT	Kontrol 25	GG	CC
Hasta 26	GA	CT	Kontrol 26	GG	CC
Hasta 27	AA	TT	Kontrol 27	GG	CT
Hasta 28	GA	CT	Kontrol 28	GG	CC
Hasta 29	AA	CC	Kontrol 29	GG	CC
Hasta 30	AA	CC	Kontrol 30	GG	CT
Hasta 31	AA	TT	Kontrol 31	GG	CT
Hasta 32	AA	CC	Kontrol 32	GG	CC
Hasta 33	AA	CC	Kontrol 33	GG	TT
Hasta 34	AA	CC	Kontrol 34	GG	CC
Hasta 35	AA	CC	Kontrol 35	GG	CT
Hasta 36	AA	CC	Kontrol 36	GG	CC
Hasta 37	AA	CC	Kontrol 37	GG	CC
Hasta 38	AA	CC	Kontrol 38	GG	CT
Hasta 39	AA	CC	Kontrol 39	GG	CC
Hasta 40	AA	CC	Kontrol 40	GG	CC
Hasta 41	AA	CC	Kontrol 41	GG	TT
Hasta 42	AA	CT	Kontrol 42	GG	CC
Hasta 43	AA	TT	Kontrol 43	GG	CC
Hasta 44	AA	CC	Kontrol 44	GG	CC
Hasta 45	AA	TT	Kontrol 45	GG	CT
Hasta 46	AA	CC	Kontrol 46	GG	CT
Hasta 47	AA	TT	Kontrol 47	GG	CT
Hasta 48	AA	CC	Kontrol 48	GG	CT
Hasta 49	AA	CC	Kontrol 49	GG	CT
Hasta 50	AA	CC	Kontrol 50	GG	CC
Hasta 51	AA	CC	Kontrol 51	GG	TT
Hasta 52	AA	CC	Kontrol 52	GG	CC
Hasta 53	AA	CT	Kontrol 53	GG	CT
Hasta 54	AA	CT	Kontrol 54	GG	CT
Hasta 55	AA	TT	Kontrol 55	GG	CC
Hasta 56	AA	CT	Kontrol 56	GG	TT
Hasta 57	AA	CT	Kontrol 57	GG	CC
Hasta 58	AA	CT	Kontrol 58	GG	CT

Çalışmamızda -308 G/A polimorfizmi için; hasta grubunun %91,37 oranında polimorfik olan AA genotipli olduğu ve %8,62 oranında ise polimorfik olan GA genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta grubuna ait -308 G/A polimorfizminin genotip yüzdeleri

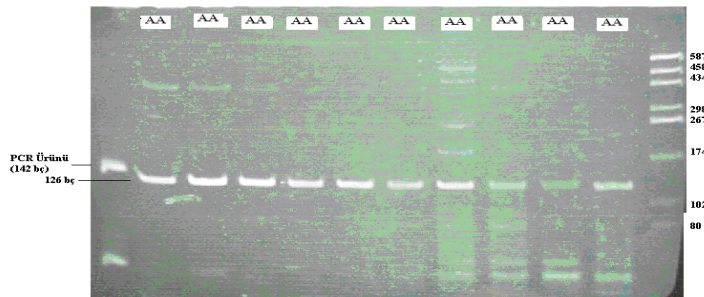
	AA (Polimorfik)	GA (Polimorfik)	GG (Normal)
Kız	18 birey %31,03	1 birey %1,72	-
Erkek	35 birey %60,34	4 birey %6,89	-
Toplam Yüzde	53 birey %91,37	5 birey %8,62	-
Normal genotip (GG)	-	-	-
Polimorfik genotip (GA ve AA)	53 birey %91,37	5 birey %8,62	-
Polimorfik Genotiplerin Toplamı ve Yüzdesi (GA+AA)	58 birey %99,9 -		-

Hastalarda normal olan homozigot GG genotipine rastlanmamıştır. Kontrol grubunda ise 53 tanesi normal olarak kabul edilen GG genotipi şeklinde tespit edilmiş olup, bunun dışında kalan 5 bireyde ise yine bir polimorfizm türü olan GA genotipi şeklindedir. Kontrol grubunda mutant olan homozigot AA genotipine rastlanmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Kontrol grubuna ait -308 G/A polimorfizminin genotip yüzdeleri

	AA (Polimorfik)	GA (Polimorfik)	GG (Normal)
Kız	-	2 birey %3,44	30 birey %51,72
Erkek	-	3 birey %5,18	23 birey %39,65
Toplam yüzde	-	5 birey %8,62	53 birey %91,37
Normal (GG)	-	-	53 birey %91,37
Polimorfik (GA ve AA)	-	5 birey %8,62	-
Polimorfik Genotiplerin Toplamı ve Yüzdesi (GA+AA)	-	58 birey %99,9	

Hasta grubunun 29, 30 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 ve 38 nolu örneklerinin PAGE görüntüsü 126 baz çiftinden oluşmakta olup, AA homozigot mutant genotipindedir (Şekil 7).



Şekil 7. -308 G/A polimorfizminde polimorfik genotipin (AA) PAGE görüntüsü

Çalışmamızda cinsiyetin hastalık ile ilişkisini belirlemek amacı ile yaptığımız varyans analizi istatistiğinin -308 G/A polimorfizminin kızlar için bulduğumuz sonuçları Tablo 8’de verilmiş olup, kızlar ile -308 G/A polimorfizmi için anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 8. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A hasta ve kontrol grubundaki kızlar arasındaki ilişkisi ($P<0,05$).

	GENOTIP	P değeri
GENOTIP	1,250	1,000
GÖZLENEN	0,001	1,000
GENOTIP – GÖZLENEN	0,001	0,001

Çalışmamızda cinsiyetin hastalık ile ilişkisini belirlemek amacı ile yaptığımız varyans analizi istatistiğinin -308 G/A polimorfizminin erkekler için bulduğumuz sonuçları Tablo 9’da verilmiş olup, kızlar için saptanan anlamlı ilişkinin tersine erkekler ile -308 G/A polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 9. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A hasta grubundaki erkekler ve kontrol grubundaki erkekler arasındaki anlamlı olmayan ilişkisi ($P>0,05$).

	GENOTIP	P değeri
GENOTIP	1,500	1,000
GÖZLENEN	0,833	1,000
GENOTIP – GÖZLENEN	1,000	1,000

Çalışmamızda hasta grubu ile -308 G/A polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile yaptığımız ikili karşılaştırma test sonuçları Tablo 10’da verilmiş olup, buna göre polimorfizm ile hastalık arasında çok anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 10. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin hastalıkla olan pozitif anlamlı ilişkisi ($P<0,05$).

	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
Değişken				Alt sınır	Üst sınır
HASTA	,001	0,001	0,001	1,000	1,000
G308A	,037	78,379	0,001	2,839	2,988

Çalışmamızda kontrol grubu ile -308 G/A polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile yaptığımız ikili karşılaştırma test sonuçları Tablo 11’de verilmiş olup, buna göre polimorfizm ile sağlıklı bireyler arasında genotip fenotip ilişkilendirilmesinin çok anlamlı olduğu bulunmuştur.

Tablo 11. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin kontrol grubu ile pozitif anlamlı ilişkisi (P<0,05).

Değişken	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
KONTROL	-1,069	0,034	0,001	-1,136	-1,002
G308A	1,069	0,034	0,001	1,002	1,136

-308 G/A polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunun birarada değerlendirildiği ikili karşılaştırma istatistiğinin sonuçları Tablo 12’de verilmiş olup, ayrı ayrı değerlendirildiği test istatistiklerinden farklı olarak t değerleri bakımından anlamsız bir ilişki saptanırken, p değerleri bakımından anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 12. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -308 G/A polimorfizminin hasta ve kontrol grupları ile pozitif anlamlı ilişkisi (p<0,05).

Değişken	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
HASTA	-1,250	0,250	0,038	-2,326	-,174
G308A	1,250	0,250	0,038	,174	2,326

Çalışmamızda -850 C/T polimorfizmi için; hasta grubunun %51,72 oranında normal CC genotipli, %27,58 oranında polimorfik CT genotipli ve %20,68 oranında ise diğer bir polimorfik yapı olan TT genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. Hasta grubuna ait -850 C/T polimorfizminin genotip yüzdeleri

	CC (Normal)	CT (Polimorfik)	TT (Polimorfik)
Kız	11 birey %18,96	3 birey %5,17	5 birey %8,62
Erkek	19 birey %32,75	13 birey %22,41	7 birey %12,06
Toplam yüzde	30 birey %51,72	16 birey %27,58	12 birey %20,68
Normal (CC)	30 birey %51,72	-	-

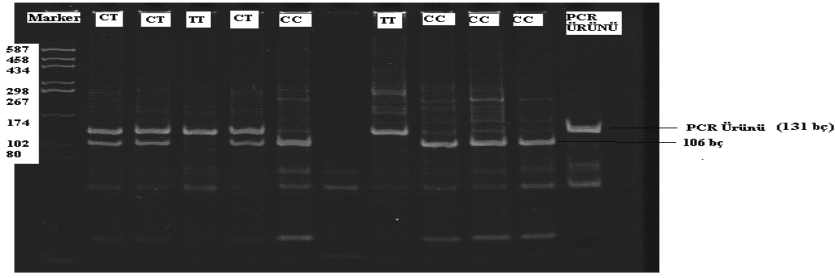
Polimorfik (CT ve TT)	-	16 birey (%27,58)	12 birey (%20,68)
Polimorfik Genotiplerin Toplamı ve Yüzdesi (CT+TT)	-	28 birey %48,26	

Kontrol grubunun ise; %53,44 oranında CC genotipli, %32,75 oranında CT genotipli ve %13,79 oranında TT genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 14).

Tablo 14. Kontrol grubuna ait -850 C/T polimorfizminin genotip yüzdeleri

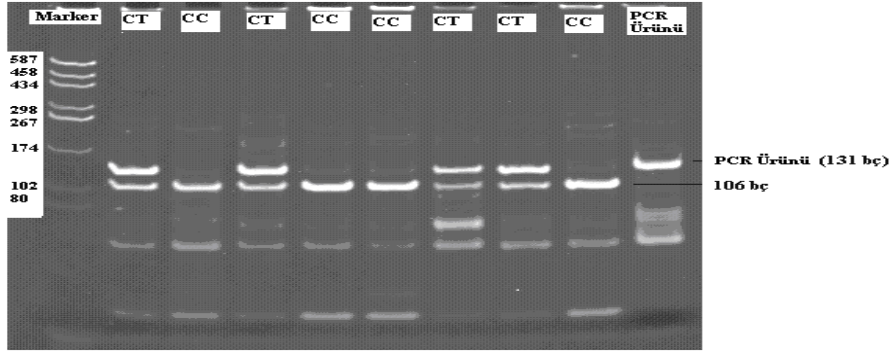
	CC (Normal)	CT (Polimorfik)	TT (Polimorfik)
Kız	12 birey %20,68	12 birey %20,68	4 birey %6,89
Erkek	19 birey %32,75	7 birey %12,06	4 birey %6,89
Toplam yüzde	31 birey %53,44	19 birey %32,75	8 birey %13,79
Normal (CC)	31 birey	-	-
Polimorfik (CT ve TT)	-	19 birey %32,75	8 birey %13,79
Polimorfik Genotiplerin Toplamı ve Yüzdesi (CT+TT)	-	27 birey %46,54	

Hasta grubunun 18, 21, 22 ve 23 nolu örneklerinin CC homozigot sağlam genotipine sahip olduğu ve PAGE görüntüsünde 106 baz çiftinden oluştuğu bulunmuştur. Polimorfik CT genotipine sahip olan 14, 15 ve 17 nolu örnekler bir allelin *Hinc II* restriksiyon enzimiyle kesilip, diğer allelin ise kesilmemesinden dolayı heterozigot karakterdedir. 16 ve 20 nolu örneklerin her iki alleli de *Hinc II* restriksiyon enzimiyle kesime uğramayarak PAGE görüntüsünde 131 baz çiftinden oluşan TT homozigot polimorfik genotipine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 8).



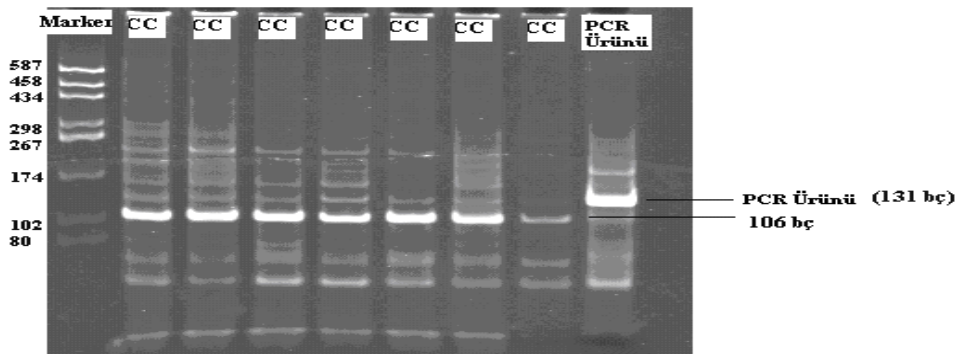
Şekil 8. -850 C/T polimorfizminde normal (CC) ve polimorfik (CT,TT) genotiplerin PAGE görüntüsü

Hasta grubunun 13, 15, 16 ve 19 nolu örnekleri ise aynı restriksiyon enzimi ile her iki allel bakımından kesime uğrayarak PAGE görüntüsünde 106 baz çiftinden oluşan bantlarla karakterize CC homozigot normal genotipinde olduğu bulunmuştur. 12, 14, 17 ve 18 nolu örnekler ise polimorfik CT genotipine sahiptir (Şekil 9).



Şekil 9. -850 C/T polimorfizminde normal (CC) ve polimorfik (CT) genotiplerin PAGE görüntüsü

Hasta grubunun 35, 36, 37, 38, 39, 40 ve 41 nolu örneklerinin tümü normal CC genotiplidir ve 106 baz çiftinden oluşmaktadır (Şekil.10).



Şekil 10. -850 C/T polimorfizminde normal genotipin (CC) PAGE görüntüsü

Çalışmamızda cinsiyetin hastalık ile ilişkisini belirlemek amacı ile yaptığımız varyans analizi istatistiğinin -850 C/T polimorfizminin kızlar için bulduğumuz sonuçları Tablo 15’de verilmiş olup, kızlar ile -850 C/T polimorfizmi için anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 15. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T hasta grubundaki kızlar ve kontrol grubundaki kızlar arasındaki pozitif anlamlı ilişkisi ($P<0,05$).

	GENOTIP	P değeri
GENOTIP	2,000	0,001
GÖZLENEN	0,001	0,001
GENOTIP – GÖZLENEN	0,001	0,001

Çalışmamızda cinsiyetin hastalık ile ilişkisini belirlemek amacı ile yaptığımız varyans analizi istatistiğinin -850 C/T polimorfizminin erkekler için bulduğumuz sonuçları Tablo 16’da verilmiş olup, kızlar için saptanan anlamlı ilişkinin tersine erkekler ile -850 C/T polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır

Tablo 16. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde varyans analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T hasta grubundaki erkekler ve kontrol grubundaki erkekler arasındaki anlamlı olmayan ilişkisi ($P>0,05$).

	GENOTIP	P değeri
GENOTIP	2,000	1,000
GÖZLENEN	2,000	1,000
GENOTIP – GÖZLENEN	1,000	1,000

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının ayrı ayrı ele alınarak -850 C/T polimorfizmi bakımından ilişkisini belirlemek amacı ile yaptığımız ikili karşılaştırma istatistiğinin sonuçları Tablo 17 ve 18’de verilmiş olup, buna göre hastalık ile -850 C/T polimorfizmi arasında hem t, hem de p değerleri bakımından anlamlı bir ilişki saptanırken, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile -850 C/T polimorfizmi arasında t değerleri bakımından anlamsız, p değerleri bakımından ise anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 17. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan -850 C/T polimorfizminin hasta grubu ile pozitif anlamlı ilişkisi ($P<0,05$).

Değişken	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
HASTA	1,664	0,070	0,001	1,525	1,803
C850T	0,500	0,047	0,001	0,408	0,592

Çalışmamızda kontrol grubu ile -850 C/T polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile yaptığımız ikili karşılaştırma istatistiğinin sonuçları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan ve -850 C/T polimorfizminin kontrol grubu ile olan pozitif anlamlı ilişkisi ($P<0,05$).

Değişken	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
KONTROL	,037	-1,086	0,001	-1,161	-1,012
C850T	,037	1,086	0,001	1,012	1,161

-850 C/T polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunun birarada değerlendirildiği ikili karşılaştırma istatistiğinin sonuçları Tablo 19’da verilmiş olup, ayrı ayrı değerlendirildiği test istatistiklerinden farklı olarak t değerleri bakımından anlamsız bir ilişki saptanırken, p değerleri bakımından anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Tablo 19. Tekrarlı ölçümlerin olduğu denemeler istatistiğinde ikili karşılaştırma analiz metoduyla hesaplanan ve -850 C/T polimorfizminin hasta ve kontrol grupları ile olan pozitif anlamlı ilişkisi ($P<0,05$).

Değişken	Standart hata	T değeri	P değeri	95% Güvenli fark aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
HASTA	-1,164	,082	,001	-1,326	-1,001
C850T	1,164	,082	,001	1,001	1,326

5. TARTIŞMA

TNF- α , immün sistemde görev alan ve monositler, makrofajlar, T ve B lenfositleri ile doğal öldürücü hücreler (NK) veya endotoksinlerle uyarılan immün sistemin diğer hücrelerden salınan bir sitokindir. TNF- α geni, 6p21.3 bölgesinde lokalize olan ve MHC gen lokusunda yer alan oldukça polimorfik bir genidir²⁴. Bağışıklık sistemimizde önemli bir göreve sahip olduğu için birçok hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır. Çeşitli otoimmün nöropsikiyatrik hastalıklarla da ilişkisi olduğu için TNF- α geninin kodlanan, kodlanmayan ve promotor bölgelerindeki değişik mutasyon ve polimorfizmler çalışılmış ve hastalıkla ilişkilendirilmesi amacıyla genotip fenotip çalışmaları yapılmıştır. Çalışmamızda da TNF- α geninin promotor bölgesindeki -308 G/A ve -850 C/T polimorfizmleri çalışılmıştır (Tablo 5).

Çalışmamızda -308 G/A polimorfizmi için; hasta grubunun %91,37 oranında polimorfik olan AA genotipli olduğu ve %8,62 oranında GA genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 6). Hastalarda normal olan homozigot GG genotipine rastlanmaması çok önemli bir bulgudur. Çalışmamızın bulgularına göre -308 G/A polimorfizminde özellikle AA genotipinin yüksek oranda bulunmasından dolayı yaptığımız önemlilik testlerinde pozitif anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0,038) (Tablo 12). -308 G/A polimorfizmi için; kontrol grubunun %91,37 oranında normal olan GG genotipli olduğu ve %8,62 oranında polimorfik GA genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 7). Bu grupta homozigot AA genotipine rastlanmaması çok önemli bir bulgudur. -308 G/A polimorfizmi için hasta bireylerin %91,37'sinin AA genotipli bulunması, kontrol grubunda ise baskın genotipin %91,37 oranında GG olması çok anlamlı ve önemlidir. Çünkü bu bulgumuz yapılacak diğer çalışmalarla desteklenmesi durumunda bir indikatör gibi hastalıkta fenotip genotip ilişkilendirilmesi için çok önemli bir moleküler parametre olabilecektir.

Farklı populasyonlarda PANDAS veya diğer nöropsikiyatrik otoimmün hastalıklarla yapılan moleküler çalışmalara göre;

a) Hindistan'da Shilpy ve arkadaşları tarafından otoimmün bir hastalık olan astım hastalığına yakalanmış kişilerle yapılan çalışmada aynı polimorfizm için hasta grubunda 3 kişinin AA genotipli, 111 kişinin GA genotipli ve 375 kişinin GG genotipli olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda ise 4 kişinin AA genotipli, 65 kişinin GA genotipli ve 407 kişinin GG genotipli olduğu bulunmuştur (p=0,004)⁴⁰. Bu çalışmanın sonucuna göre

polimorfizmin hastalıkla olan ilişkisi pozitif olarak anlamlıdır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

b) Kanadalı araştırmacı Zai ve arkadaşları tarafından obsesif kompulsif bozukluğu olan hastalarla yapılan çalışmada -308 G/A polimorfizminin hastalıkla herhangi bir ilişkisinin olmadığı bulunmuştur⁴¹. Oysa bizim çalışmamızda polimorfizm hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Sonuçların farklı olması etnik köken kaynaklı olabileceği gibi, seçilen gruplardaki bireylerin farklı olmasından veya yaşam şartlarının değişik olmasından kaynaklandığı gibi multifaktöriyel kalıtım gösteren ve çok sayıda genin katılımıyla ortaya çıktığı düşünülen PANDAS gibi kompleks hastalıklarda polimorfizm ile hastalığa yatkınlık arasındaki ilişkinin gösterilmesi için çok sayıda genin aynı anda değerlendirilmesini zorunlu hale getirmektedir.

c) İtalya'da Boin ve arkadaşlarının PANDAS'tan farklı bir kliniğe sahip şizofreni (nöropsikiyatrik hastalık) hastalarıyla yaptığı çalışmada; hasta grubunda GA genotipi, kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunmuştur. AA genotipi ise sadece hasta grubunda gözlenmiştir. Şizofreni hastalarında bu polimorfizmin hastalıkla ilişkili olduğunu saptamışlardır⁴². Diğer bir çalışmada şizofreni hastalarında -308 G/A, -238 G/A, -857 C/T ve -1031 C/T polimorfizmleri çalışılmış olup, bu polimorfizmlerin hiçbirisinin hastalık riskini arttırmadığı belirlenmiştir⁴³. Oysa çalışmamızda -308 G/A polimorfizmi ile PANDAS hastalığı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur.

d) Brezilya'da Rajendranath ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada A grubu beta hemolitik streptokok bakterilerinin yol açtığı romatizmal ateş hastalığına yakalanmış hastalarda TNF- α geninin promotor bölgesindeki -308 G/A polimorfizminin hastalıkla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur⁴⁴. Çalışmamızda bulduğumuz sonuç ile bu sonuç benzerlik göstermektedir.

e) Ülkemizde Berdeli ve arkadaşlarının akut romatizmal ateşli hastalarla yaptıkları çalışmada; -308 G/A polimorfizmi ile hastalığın mekanizması arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır⁴⁵. Bu durumun nedeninin major histokompatibilite kompleksi (MHC) gen bölgesindeki TNF alfa geninin bu bölgedeki diğer genlerle etkileşimi olabilir.

Benzer çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirmelerde immün cevaba dayalı PANDAS ve benzeri bazı hastalıklarda TNF- α geni promotor bölgesindeki polimorfizm ile ilgili hastalığa genetik yatkınlık arasında bizim bulgularımıza benzer olarak bazı araştırmalarda anlamlı, bazılarında ise anlamsız ilişki saptanmış olmasının nedenleri olarak şunları düşünmekteyiz;

1.Hastalığın tam olarak tanımlanamadığını ve moleküler mekanizmasının net olmadığını

2. Hastalığa yatkınlığın multifaktöriyel ve poligenik olarak ortaya çıktığını

3. TNF- α geni dışında çok sayıda genin de karıştığını ve bu genler arasındaki etkileşimin PANDAS hastalığını kompleks hastalıklar grubuna soktuğunu düşündürmektedir.

-308 G/A polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda cinsiyete göre yapılan önemlilik testlerinde kızlar bakımından hem hasta grubu içerisinde, hem de kontrol grubu içerisinde anlamlı ilişki saptanırken, aynı anlamlı ilişkiye erkekler arasında rastlanmamıştır. Demirhan O. ve arkadaşlarının Türk populasyonunda şizofreni ve psikiyatri hastalarıyla yaptıkları sitogenetik çalışmada 6p21 bölgesinin folata duyarlı frajil bölgeler içerisinde tanımlanmış olması, immün sistemle ilgili olan bu kromozom bölgesinin hastalığa yakalanmada duyarlı bir bölge olduğunu ve genetik yatkınlığı göstermesi bakımından önemlidir^{46,47}. Çalışmamızda – 308 G/A ve –850 C/T polimorfizmlerinde hastalık ile ilişkinin anlamlı bulunması kız hastalardan kaynaklanmaktadır. Cinsiyet ve immün sistem ile ilişkili genlerin koordineli veya bağımsız çalışması bu durumun nedeni olarak düşünülebilir. Genomda folata duyarlı kromozom bölgelerinin frajilitesine rastlanması ve X kromozomunun da frajil kromozomlar arasında yer alması, kızlar için bulduğumuz bu anlamlı ilişkinin nedenlerinden birisi olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda -850 C/T polimorfizmi için; hasta grubunun %51,72 oranında CC genotipli, %27,58 oranında CT genotipli ve %20,68 oranında TT genotipli olduğu (Tablo 13), kontrol grubunun ise; %53,44 oranında CC genotipli, %32,75 oranında CT genotipli ve %13,79 oranında TT genotipli olduğu bulunmuştur (Tablo 14).

Yapılan tekrarlı ölçüm istatistiklerinde -850 C/T polimorfizmi için de hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı pozitif bir ilişkinin tespit edilmiş olması, hastalıkta genotip fenotip ilişkilendirilmesi için çok önemli bir moleküler gösterge olabileceğini düşündürmekle beraber, bu konuda benzer genle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamış olması bu bulgunun desteklenmesi ve teyit edilmesi için yapılacak benzer çalışmalara ihtiyaç göstermektedir.

-850 C/T polimorfizmi için de cinsiyete göre yapılan önemlilik testlerinde kızlar bakımından hem hasta grubu içerisinde, hem de kontrol grubu içerisinde anlamlı ilişki saptanırken (Tablo 15), aynı anlamlı ilişkiye erkekler arasında rastlanmamıştır (Tablo 16).

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Her ne kadar TNF- α geninin promotor bölgesinde çalıştığımız -308 G/A ve -850 C/T polimorfizmlerinin hastalıkta fenotip genotip ilişkilendirilmesi bakımından çok anlamlı sayılabilecek ilişki saptamış olmamıza rağmen, bazı çalışmalarda benzer bulguların gözlenmesi^{40,42,44,46,47}, bazılarında ise farklı sonuçların elde edilmiş olması^{41,43,45}, bazı polimorfizmler için de ilgili gende hiçbir polimorfizmin çalışılmamış olması PANDAS hastalığının moleküler anlamda tanımlanabilmesi için aşağıda önerilen çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

Promotor bölgesinde yer alan -308G/A ve -850 C/T polimorfizmleri dışında CT ve CA dizilerinde yer alan polimorfizmlerin saptanması ve PANDAS'a duyarlı bireylerin hangi TNF alleleline sahip olduğunun da belirlenebilmesi amacıyla, tüm TNF geninin dizi analiziyle belirlenmesinin yanı sıra yüksek polimorfizm gösteren MHC haplotiplerinin de belirlenmesi.

Hastaların immün sistemde rolü olduğu belirlenen aday genlerinde mutasyona rastlanmasa bile yeni genetik perspektife göre; epigenetik olarak tanımlanan, ilgili genlerin metilasyonuna bağlı inaktivasyonu söz konusu olabileceği için metilasyon paternlerinin değerlendirilmesi.

Poligenik olarak ortaya çıkan birçok nörodejeneratif hastalığın semptomları birbirine benzemektedir. Fakat herbir hastalığı birbirinden ayıran özelliklerinin de olduğu göz önünde bulundurularak bunların tespit edilebilmesi için örnek grubunun çok iyi seçilmesi, hastalık kriterlerinin iyi konması ve immün sistemde çok sayıda genin eş zamanlı olarak ekspresyon profillerine bakılması.

PANDAS'lı bazı hastaların bazal gangliyonunda antinöronal antikörlerin gösterilmiş olması; antikör sentezinde çok önemli rol oynayan Rekombinasyon Aktive Edici Gen (RAG) ve bunun ürünleri olan RAG₁ ve RAG₂ enzimlerinin rolünü göstermesi bakımından önemlidir. Bu enzimler, antikör oluşumu sırasında ağır zincirin V, D ve J segmentlerinin 3' ucundaki rekombinasyon sinyal dizilerinin bulunduğu DNA bölgelerinde çift iplik kırıklarına yol açarak bu diziler aracılığıyla rekombinasyonu sağlamaktadırlar. Çift iplik kırıkları daha sonra non homolog rekombinasyonel tamir mekanizması ile tamir edilmektedir¹. RAG geninde veya tamir mekanizmasında meydana gelebilecek mutasyonların bozuk antikör oluşumuna yol açması, otoimmün hastalıkların mekanizmasının açığa kavuşturulması için yapılacak araştırmalarda önem arz etmektedir. Gelecekte hastalığın moleküler mekanizması ile ilgili

yapılacak çalışmalar, bu gen dizisinin dizi analizi gibi teknikleri ile araştırılmasını önemli hale getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Doç.Dr.Ümit LÜLEYAP.** Moleküler Genetiğin Esasları, 1.Baskı.Adana.Nobel Kitabevi, **2008.**
2. **T. Cengiz, K. Hakan.** Depresyon, Sitokinler ve Bağışıklık Sistemi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni.* **2003**;13:142-150.
3. **Gımsal A, Topçuoğlu V, Yazgan Y.** Akut Romatizmal Ateş, Sydenham Koresi ve Psikopatoloji. *Türk Psikiyatri Dergisi.***2002**; 13(2): 137-141.
4. <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=12&Article=210>. Erişimtarihi:01.01.2007.
5. <http://www.duzen.com.tr/index.aspx?ISLEM=MAKALEGOSTER&ID=19>.Erişim tarihi:02.02.2007.
6. **Bayraktar E, Kala Y.** Obsesif - Kompulsif Bozukluğun Etiyopatogenezinde Yeni Bir Boyut: PANDAS. *Klinik Psikofarmakoloji Bülten.* **2000**;10:144-152.
7. **Rocha F, Correa H, Teixeira A.** Obsessive-compulsive disorder and immunology: A review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2008**;32(5):1139-46.
8. **Bektaş D, Çaylan R.** Streptokok İnfeksiyonu Sonucu Gelişen Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalıklar (PANDAS). *Türkiye Klinikleri JENT.* **2004**;4:120-124.
9. **Allen AJ, Leonard HL, Swedo SE.** Case study: A new infection-triggered autoimmune subtype of pediatric OCD and Tourette's Syndrome. *Journal of American Child and Adolescent Psychiatry.* **1995**;34:307-311.
10. **Giulino L, Gammon P, Sullivan K, Franklin M, Foa E, Maid R, & March JS.** Is parental report of upper respiratory infection at the onset of obsessive compulsive disorder suggestive of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with streptococcal infection? *Journal of Child and Adolescent psychopharmacology.* **2002**;12:157-164.
11. **Swedo SE, Leonard HL, Mittleman BB, Allen AJ, Rapoport JL, Dow SP, Kanter ME, Chapman F, Zabriskie J.** Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. *American Journal of Psychiatry.* **1997**;154 (1):110-112.
12. <http://209.85.135.104/search?q=cache:PbhA9nlRvgeJ:www.ttb.org.tr/STED/sted101/obsesif.pdf+%C3%87ocuk+ve+Ergenlerde+Obsesif+Kompulsif+Bozukluk.&hl=tr&ct=clnk&cd=1&gl=tr>. Erişim tarihi: 29.10.2006.
13. **Topçuoğlu V, Aksoy A, Cömert B.** Obsesif Kompulsif Bozuklukta Beyin Görüntüleme Çalışmaları *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni.* **2003**;13:151-160.

14. **Susan E. Swedo, Henrietta L. Leonard, M.D, Marjorie Garvey, Barbara Mittleman, Albert J. Allen, Susan Perlmutter, Lorraine Lougee, Sara Dow, Jason Zamkoff and Billinda K. Dubbert.** Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated With Streptococcal Infections: Clinical Description of the First 50 Cases. *Am J Psychiatry*. **1998**; 155:264–271.
15. <http://209.85.135.104/search?q=cache:KO16OWr16VIJ:linik psikiyatri.org/files/journals/1/351>. Erişim tarihi:18.05.2007.
16. <http://www.blackwellsynergy.com/doi/pdf/10.1111/j.14401819.2006.01475x>. Erişim tarihi:29.12.2006.
17. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4S-4MFCW5N-4&_user=613195&_coverDate=02%2F01%2F2007&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000031979&_version=1&_urlVersion=0&_userid=613195&md5=e1ae3fd8b5fae18dd96ca6cdd379e9d2. Erişim tarihi:07.02.2008.
18. **Dinn WM, Harris CL, McGonigal KM, Raynard RC.** Obsessive-compulsive disorder and immunocompetence. *Int J Psychiatry Med*. **2001**;31(3):311-20.
19. **Rink L, Kirchner H.** Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch Allergy Immunol*. **1996**;111(3):199-209.
20. <http://www.ankemdernegi.org.tr/ANKEMJOURNAL/PDF/ANKEM>. Erişim tarihi:18.12.2006.
21. http://dbimmun.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr_48413.html. Erişim tarihi:05.11.2007.
22. **Marin M, Shu-Shyan W, Pestka J.** Increased IL-1, IL-6 and TNF α secretion and mRNA levels in WEHI-3 cells exposed to cyclopiazonic acid *Toxicology*. **1996**;114,15:67-79.
23. http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=163. Erişim tarihi:05.10.2007.
24. http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha. Erişim tarihi:05.09.2007.
25. http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha.
26. <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=6>. Erişim tarihi:06.08.2007.
27. http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha_gene_structure. Erişim tarihi:06.01.2008.
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Tumor_necrosis_factor-alpha. Erişim tarihi:05.10.2007.

29. http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020755.html. Erişim tarihi:15.02.2008.
30. <http://www1.cs.columbia.edu/~cleslie/cs4761/genestructure.gif>. Erişim tarihi:19.11.2007.
31. **Paul A.** Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor- α production. *Ann Rheum Dis.* **2000**;59:3–53.
32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7124&ordinalpos=8&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum. Erişim tarihi:02.04.2008.
33. **Russell C. Dale, Mrcp.** Post-streptococcal autoimmune psychiatric and movement disorders in children. *The British Journal of Psychiatry.* **2002**;181: 188-190.
34. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sitokin>. Erişim tarihi:04.01.2008.
35. http://www.argyllbiotechnologies.com/images/immune_overview/TNFa_Crystal_Structure.rsh.png. Erişim tarihi:05.03.2008.
36. http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/v_cag/new_page_2.htm. Erişim tarihi:10.01.2008.
37. **Çarin M.** Transplantasyon ve İmmün Yanıt. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ABD,Transplantasyon Ünitesi.
38. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.*Nucleic Acids Res*,**1998**; 16(3): 125.
39. **İşcan M.** Moleküler Genetikte Modern Teknikler. Telefoncu A, Küfreviođlu Öİ, Pazarlıoğlu N. *Biyoinformatik-I*. 1. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 71-82, **2003**.
40. **Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma S, Ghosh B.** Association of TNF Haplotypes with Asthma, Serum IgE Levels, and Correlation with Serum TNF- α Levels. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* **2006**;Vol. 35, pp. 488-495.
41. **Zai G, Arnold PD, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL.** Tumor necrosis factor-alpha gene is not associated with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet.* **2006**;16(1):43-5.
42. **Boin F, Zanardini R, Pioli R, Altamura CA, Maes M, Gennarelli M.** Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* **2001**;6(1):79-82.
43. **Watanabe Y, Muratake T, Kaneko N, Fukui N, Nara Y, Someya T.** No association between the tumor necrosis factor-alpha gene promotor polymorphisms and schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry Res.* **2007**; 30;153(1):1-6.

44. **Ramasawmy R, Faé K, Spina G, Victora G, Tanaka A, Palácios S, Hounie A, Miguel E, Oshiro S, Goldberg A, Kalil J, Guilherme L.** Association of polymorphisms within the promotor region of the tumor necrosis factor- α with clinical outcomes of rheumatic fever. *Molecular immunology*. **2007**;44, n^o8, pp. 1873-1878.
45. **Berdeli A, Tabel Y, Celik HA, Ozyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH.** Lack of association between TNFalpha gene polymorphism at position -308 and risk of acute rheumatic fever in Turkish patients. *Scand J Rheumatol*. **2006**;35(1):44-7.
46. **Demirhan O, Tastemir D, Sertdemir Y.** Chromosomal fragile sites in schizophrenic patients. *Genetika*. **2006**;42(7):985-92.
47. **Taştemir D, Demirhan O, Sertdemir Y.** Chromosomal fragile site expression in Turkish psychiatric patients. *Psychiatry Res*. **2006**;15;144(2-3):197-203.
48. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**.

EKLER

EK-1.Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı

1.Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning Kataloğu” esas alınmıştır⁴⁸.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılmıştır.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)⁴⁸.

1.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1.1.2. Stok Solüsyonlar

a) Eritrozis Lizis Tampon Hazırlama

- 109.5 gr Sukroz tartıldı
- 1.211 gr Tris (Ph: 7.5) tartıldı
- 1.017 gr $MgCl_2$ tartıldı
- 900 ml saf su ile $MgCl_2$ ve Tris şişede karıştırıldı
- Ph'sı 7.5'a ayarlandı
- Sukroz eklendi
- 200 µl Triton X 100 ilave edildi
- Otoklavlandı
- Buzdolabında saklandı

b) Fizyolojik Tampon Hazırlama

- 4.383 gr NaCl tartıldı
- 9.305 gr EDTA tartıldı
- NaCl ve EDTA karıştırılıp saf su ile 1 litreye tamamlandı
- pH'sı 7.4'e ayarlandı

- Buzdolabında saklandı

c) TE-9 Hazırlama

- 30.25 gr Tris tartıldı
- 3.72 gr EDTA tartıldı
- 0.29 gr NaCl tartıldı
- Tris, EDTA, NaCl karıştırılıp saf su ile 500 ml'ye tamamlandı
- pH'sı 9'a ayarlandı
- Buzdolabında saklandı

d) %10'luk SDS Hazırlama

- 10 gr Sodiumdodecylsulfate tartıldı
- 100 ml saf su ile karıştırıldı
- Oda ısısında muhafaza edildi

e) Proteinaz K Hazırlama

- 10mg/ml hazır toz halindeki Proteinaz K
- 5 ml saf su ile karıştırıldı
- 10-15 dk çalkalandı
- 0.5 ml'lik porsiyonlara ayrıldı
- -20 ° C'de muhafaza edildi

f) % 70 Etil Alkol Hazırlama

- 70 ml %100'lük etil alkole
- 30 ml saf su eklendi
- Oda ısısında muhafaza edildi.

g) Akrilamid Hazırlama

- 38,7 gr Akrilamid tartıldı

- 1,3 gr Bisakrilamid tartıldı
- 100 ml'lik behere kondu
- Üzerine 80 cc saf su eklendi
- Karıştırıldı
- 100 cc'ye tamamlandı
- 37 C⁰'de 1 saat bekletildi.

EK-2. PCR

PCR ilk kez Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında, Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında icat edilmiştir³⁹. PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Her bir PCR döngüsü, reaksiyon karışımının, reaksiyonun gerçekleşmesi için daha önceden belirlenmiş olan en uygun üç sıcaklık derecesi arasında transfer edilmesi ile tamamlanır. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1 000 000 kez artış olur. Reaksiyon boyunca gereken sıcaklık, süre, döngü sayılarını kontrolü ve otomasyonu Thermal Cycler olarak bilinen cihazlarla yapılır. Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere, bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir. DNA çift sarmalı üzerinde bulunan karşılıklı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak, primerlerin yapışabileceği tek iplikli DNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan sıcaklık denatürasyon sıcaklığıdır (genellikle 94 °C). Burada kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Bu süreç yaklaşık 5 dakikadır ve bu süreçte enzimler çalışmaz⁴⁸.

Primerlerin tek iplikli DNA molekülü üzerinde komplementer olduğu bölgelere hibridize olduğu sıcaklık annealing (yapışma) sıcaklığıdır. Annealing sıcaklığı primer uzunluğuna ve baz içeriğine göre değişir. Reaksiyonun özgülüğü için son derece önemlidir. Primer-kalıp DNA hibridizasyonu sıcaklığa bağlı bir olay olduğundan annealing sıcaklığı hibridizasyonun oluşumunu sağlayacak kadar düşük ve yanlış bağlanmalara izin vermeyecek kadar da yüksek olmalıdır. Bu sıcaklık 50-70 °C arasındadır. DNA polimeraz için optimum olan sıcaklık ise uzama (sentez) sıcaklığı olarak belirtilir. Bu sıcaklık kullanılan DNA polimerazlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin Tag DNA polimeraz için 72 °C iken Pwo için 68 °C'dir. Polimeraz enzim, nükleotidleri 5'den 3'e doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar⁴⁸.

2.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları

2.1.1. Kalıp Genomik DNA

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapar. Yapılacak olan çalışmaya göre herhangi bir canlının kanından ve dokusundan izole edilebilir⁴⁸.

2.1.2. Primerler

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir. Ayrıca polimerizasyon reaksiyonları için DNA polimeraz enzimine primer görevi yaparlar. Primerler sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin kanat bölgelerine komplementer olmalıdır. Aksi takdirde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenebilir. Bu nedenle reaksiyonun istenilen yönde gerçekleşmesini sağlayan en temel faktörlerden biridir ve seçiminde şu hususlara dikkat edilmelidir.

Primer dizisi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.

Kullanılan primerlerin kendi aralarında ve dizileri içerisinde komplementer bölgeler olmamalı.

Timin nükleotidi yanlış eşleşmeye daha toleranslı olduğundan 3' uçlarında bulunmamalı.

Tm'leri aynı veya çok yakın olmalı.

GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı.

Herhangi bir baz 4'den fazla arka arkaya tekrar etmemeli⁴⁸.

2.1.3. Reaksiyon Tamponu

PCR reaksiyonunda, reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (iyonik direnci, pH, Mg⁺² gibi) karışımdır⁴⁸.

2.1.4. DNA Polimeraz

PCR reaksiyonunda polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzimdir. Isıya dayanıklı termofilik bakterilerden izole edildiğinden ötürü yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır⁴⁸.

2.1.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)

PCR reaksiyonunda, polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluşturur⁴⁸.

EK-3. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Verilerimizin istatistiksel analizlerinde SPSS 10.0 programı kullanıldı. Parametreler, tekrarlı ölçümler (Repeated measures), varyans analizi ve ikili karşılaştırma (Pairwise comparisons) metodları ile analiz edildi. $P < 0,05$ olan değerleri kapsayan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

ÖZGEÇMİŞ

20.11.1982 yılında Adana'da doğdu. İlkokul eğitimini Akdeniz Kolejinde, orta ve lise eğitimini Adana Koleji'nde tamamladıktan sonra 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi. 3. sınıf stajını Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında tamamladı. 2005 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Şu an tez aşaması çalışmalarını sonlandırmakta olup, aynı bölümde çalışmalarına devam etmektedir.