

**SCCA GENLERİNİN ASTIMLA İLGİLİ GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİNİN SAPTANMASI VE ASTIM
PATOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DETECTION OF SCCA GENES VARIATIONS RELEVANT
TO ASTHMA AND INVESTIGATION OF EFFECT ON THE
ASTHMA PATHOLOGY**

İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI 'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye (Danışman) :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

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

Prof. Dr. Adil Denizli

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BU TEZ ÇALIŞMASI TÜBİTAK BİLİM İNSANI DESTEKLEME DAİRE BAŞKANLIĞI YURTIÇİ-YURTDIŞI BÜTÜNLEŞTİRİLMİŞ DOKTORA PROGRAMI (TÜBİTAK-BİDEB-BDP) VE PROF. DR. CAN ÖMER KALAYCI'NIN YÜRÜTÜCÜLÜĞÜNÜ YAPTIĞI TÜBİTAK SBAG-3235 NUMARALI PROJE TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR

SCCA GENLERİNİN ASTIMLA İLGİLİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİNİN SAPTANMASI VE ASTIM PATOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İbrahim Çağatay Karaaslan

ÖZ

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir genetik hastalıktır. Hastalıkla ilişkili genler ile bu genlerin işlevsel olduğu metabolik yolların ortaya konması, astım tanısı ve tedavisinde yeni açılımlar sağlayacaktır.

Sağlıklı bir akciğerde, proteaz ve proteaz inhibitörleri denge içerisinde çalışarak doku homeostazını, yenilenme ve tamir gibi olayları düzenler. Astım gibi inflamatuvar akciğer hastalıklarında proteaz aktivitesinde artış gözlemlenir. Proteaz ve proteaz inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması iç kaynaklı ve dış kaynaklı proteaz miktarındaki artışa bağlı olabilir. Astım patogenezi proteaz inhibitörlerin rollerini açıklayan bazı kanıtlar bulunsada, bunlar tüm mekanizmayı açıklamak için yeterli değildir.

Son dönemde yapılan çalışmalar Skuamoz Hücre Kanser Antijen 1 ve Skuamoz Hücre Kanser Antijen 2 (SCCA1 ve SCCA2) proteinlerinin astım patogenezi ile ilişkili olabileceğini göstermesine karşın proteinlerin etki mekanizmalarıyla ilişkili bilgilerimiz son derece sınırlıdır.

Bu tez çalışmasının amacı, SCCA1 ve SCCA2 genlerinin astımda oynadıkları rolleri belirlemek ve günümüzde tam olarak anlaşılamamış astım patogenezinin açıklamasına katkıda bulunmaktır.

Bu amaç doğrultusunda, SCCA1 ve SCCA2 genlerinin 5' uç bölgelerinin astımla ilişkili olabilecek genetik varyasyonları DNA dizi analiz yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bulunan varyasyonların astım tanısı ve astım fenotipi ile olan ilişkisi incelenmiştir.

SCCA1 proteininin hücre ölümü ve musin salınımı üzerine olan etkisi hücre kültür yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Son olarak astım patolojisinde önemli rolü olan eozinofillerde, bazal ve sitokinlerle uyarılmış düzeylerde SCCA1 ifadesi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, SCCA 1 geninin promotor bölgesinde atopik astımla ilişkili olabileceği öngörülen polimorfizmler saptanmıştır. Astımlı ve sağlıklı bireyler arasında polimorfizmlerin görülme sıklığında önemli bir fark bulunamamasına karşın, homozigot polimorfizmlerin görülme sıklığı atopik astımlılarda, atopik olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur. A549 akciğer epitel hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarında SCCA1 proteininin hidrojen peroksit ile uyarılan hücre ölümünü (olası apoptoz) engellediğine ve musin ifadesini transkripsiyonal düzeyde baskıladığına dair bulgular elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, SCCA1 proteininin astım patogenezi proteaz inhibitör etkisinden farklı hücresel yollar üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astım, atopi, SCCA1, SCCA2, genetik varyasyon, hücre ölümü, musin.

Danışman: Prof. Dr. Cihan Öner, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı.

DETECTION OF SCCA GENES VARIATIONS RELEVANT TO ASTHMA AND INVESTIGATION OF EFFECT ON THE ASTHMA PATHOLOGY

İbrahim Çağatay Karaaslan

ABSTRACT

Asthma is a complex genetic disease in which both genetic and environmental factors play a role. Revealing disease related genes and the metabolic pathways will provide new developments for the diagnosis and treatment of asthma.

In the healthy lung, protease and protease inhibitor work in balance for tissue homeostasis and regulation of regeneration and repair processes. Increased protease activity has been observed in the inflammatory lung diseases such as asthma. Disruption of protease and their inhibitors balance may depend on rising endogenous and exogenous protease amount. Even though some evidence found for protease inhibitors' role in asthma pathogenesis, these are not enough for explanation of whole mechanism.

Although recent studies showed that Squamous Cell Carcinoma Antigen 1 and Squamous Cell Carcinoma Antigen 2 (SCCA1 and SCCA2) proteins which are protease inhibitors could be related to asthma pathogenesis. Our knowledge about these proteins role in asthma pathogenesis is very limited.

The goal of this thesis studies is to determine the role of SCCA1 and SCCA2 genes in asthma and make contribution to the unrevealing of not accurately understood pathogenesis of asthma.

Through this goal, genetic variations in the 5' end regions of the SCCA1 and SCCA2 genes are investigated with DNA sequence analysis. Relation of the variations with asthma diagnosis and asthma phenotype is investigated; effect of polymorphisms found in the promoter region of SCCA1 on promoter activity is examined.

Effect of SCCA1 protein on cell death and mucin secretion is investigated with cell culture method. Finally in eosinophils, that have an important role in asthma pathogenesis, SCCA1 expression in basal and cytokine stimulated levels is examined.

In this study, in SCCA1 gene's promoter region, polymorphisms that can be related to asthma are determined. Although the frequency of polymorphisms were not found significantly different between asthmatic and healthy individuals, the frequency of homozygous polymorphisms in atopic asthma are found to be higher than non atopic type. In cell culture studies with A549 lung epithelial cells, evidences found that SCCA1 protein prevents cell death (probable apoptosis) induced by hydrogen peroxide and suppresses mucin expression at the transcriptional level.

Obtained results suggested that in asthma pathogenesis SCCA1 protein could be effective on cellular pathways other than protease inhibitor effect.

Key Words: Asthma, atopy, SCCA1, SCCA2, genetic variation, cell death, mucin.

Advisor: Prof. Dr. Cihan Öner, Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Molecular Biology Section.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yol gösteren, çalışmalarım için hem teorik hem pratik yardımlarını esirgemeyen, karşılaştığım güçlükler karşısında ayakta kalmamı sağlayacak bilimsel temeli ve hayat tecrübesini veren, bilimsel düşünmenin ne demek olduğunu öğreten değerli danışman hocam Prof. Dr. Cihan Öner'e,

Çalışmalarım süresince her türlü konuda ilgisini, anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Reyhan Öner'e

Doktora çalışmalarım boyunca desteğini her an yanımda hissettiğim, karşılaştığım sorunlar karşısında yardımlarını esirgemeyen, hayata ve bilime bakış açımın gelişmesinde katkı sağlayan, klinik ve laboratuvar desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı'ya ve Doç. Dr. Cansın Saçkesen'e

Doktora çalışmalarımın Amerika'da geçen süresi boyunca bana danışmanlık yapan, geçirdiğim süre boyunca her türlü sorunumla ilgilenen, şehri ve çalıştığım ortamı sevdiiren, laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullandıran Doç. Dr. Şule Çataltepe'ye

Uzun yıllar beraber aynı laboratuvarları paylaştığımız ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Dr. Ceren Acar, Dr. M.Mert Sözen, Dr. Zekiye Bakkaloğlu'na ve laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili dostum Dr. Esra Birben'e,

İhtiyacım olduğunda moral desteği veren, deneysel konularda yardımını esirgemeyen sevgili Arş. Görev.Sibel Küçükyıldırım'a,

Yıllardır sabırla bana destek olan, karşılaştığım tüm güçlüklerde her zaman yanımda olan biricik dostum Sibel Ünlü' ye

Yüksek lisans ve doktora sürem boyunca her konuda deneyim ve yardımına başvurduğum, karşılaştığım sorun ne olursa olsun sabırla beni dinleyen ve yol gösteren, çözüm için elinden gelen çabayı harcayan değerli hocam Doç. Dr. Hatice Mergen'e

Ve dünyadaki en değerli varlığım **AİLEME**,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİ	5
2.1. Astım Genetiği	6
2.1.1. Bağlantı (Linkaj) ve Pozisyonel Klonlama Çalışmaları	6
2.1.2. Genom-Kapsamlı İlişkilendirme Çalışmaları	7
2.1.3 Aday Gen Çalışmaları	7
2.2. Astım Patolojisinde Rol Oynayan Hücresel Yollar	8
2.2.1. Th2 Lenfositler ve Sitokinleri Astım Patogenezine Üzerine Olan Etkileri	10
2.2.2. IL-4 ve Özellikle IL-13 Astım Patogenezinde Rol Alan En Önemli Sitokinlerdendir	11
2.2.3. Astım Patolojisinde Bronş Epiteli - IL-4/ IL-13 Etkileşimi	14
2.3. IL-4 ve IL-13 İnsan Bronş Epitel Hücresinde Skuamoz Hücre Kanseri Antijeni (Squamous Cell Carcinoma Antigen: SCCA) Olan SCCA1 (SERPİN3) ve SCCA2 (SERPİN4)'nin Gen İfadesini 20 Kat Arttırmaktadır	16
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	30
3.2. Kandan DNA İzolasyonu	30
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	31
3.3.1 SCCA1 ve SCCA2 Genlerinin Promotor ve 5' UTR (5' Translasyona Uğramayan Bölge) Bölgelerinin Amplifikasyonu	33
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Ürünlerinin Saflaştırılması	34
3.5. Otomatik DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)	34
3.6. SCCA1 Genotipleme Metodu	35
3.6.1. SCCA1 Genotipleme için PZR Koşulları	36
3.6.2. A/w26/ Restriksiyon Enzimi Kesim Koşulları	37

3.7. SCCA2 Genotipleme Metodu.....	37
3.7.1. PZR Koşulları.....	39
3.7.2. <i>Bsa</i> I Enzimi Kesim Koşulları	39
3.8. Kandan Eozinofil İzolasyonu ve Kültürü.....	40
3.9. Hücre Canlılığı ve Kontrollü Hücre Ölümünün Ölçümü	41
3.9.1. Lipofektamin ile Transfeksiyon.....	42
3.9.2. SCCA1 Proteininin Western Blot ile Ölçülmesi	42
3.9.3. MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] Yöntemi Kullanarak H ₂ O ₂ ile Uyarılmış Hücrelerde SCCA1'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	43
3.9.4. Anneksin (Annexin) V-FITC/ 7-AAD ile Kontrollü Hücre Ölümünün (Apopitoz) Ölçümü	43
3.10. MUC5AC (Musin 5 Alt tip AC) İfadesinin A549 Hücrelerinde RT-PZR Yöntemiyle Ölçümü.....	45
3.11. İstatistiksel Analiz.....	45
4.SONUÇLAR	46
4.1 SCCA1 Geni Promotor Bölgesinde DNA Dizi Analizi Sonucunda Tanımlanmış Polimorfizmler	48
4.2 SCCA2 Geni Promotor Bölgesinde DNA Dizi Analizi Sonucunda Tanımlanan Polimorfizm.....	56
4.3. SCCA1 Geni 1. Ekzonunun DNA Dizi Analiz Sonucu	57
4.4 SCCA1 Promotor Bölgesinde yer alan Pol 1, Pol 2, Pol 3 ve Pol 4 Polimorfizmlerinin Genotipleme Sonuçları	58
4.5. SCCA2 Promotor Bölgesinde yer alan Pol 5 Polimorfizminin Genotipleme Sonucu.....	60
4.6. Eozinofillerde SCCA1 İfadesi.....	62
4.7. SCCA1 pcDNA Ekspresyon Vektörü ile Transfekte Edilmiş A549 Hücre Lizatlarının Western Blot Sonucu.....	65
4.8. SCCA1'in, Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Tarafından indüklenen Hücre Ölümü (Olası Apopitoz) Üzerine Etkisi	66
5. TARTIŞMA	69
6. KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Astım gelişiminde rol oynayan gen-gen ve gen-çevre etkileşimi	5
Şekil 2.2. Astım patolojisinde görev alan hücreler ve birbirleriyle olan etkileşimleri	8
Şekil 2.3. T yardımcı hücrelerin farklılaşması ve sentezledikleri sitokinler	9
Şekil 2.4. Astımda rol oynayan hücreler ve onların salgıladıkları sitokinlerin olası görevleri şekil üzerinde gösterilmiştir.	10
Şekil 2.5: IL-4'ün B ve T hücresi üzerine biyolojik olan etkisi gösterilmektedir	12
Şekil 2.6: STAT-6 proteinin IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile etkileşimi şekil üzerinde gösterilmektedir	15
Şekil 2.7: SCCA1 geninin promotor, 5'UTR, ekzon, intron ve 3'UTR bölgelerinin DNA dizilimi	20
Şekil 2.8: SCCA1 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi.	21
Şekil 2.9: SCCA2 geninin promotor, 5'UTR, ekzon, intron ve 3'UTR bölgelerinin DNA dizilimi	23
Şekil 2.10. SCCA2 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi	24
Şekil 2.11. Apoptotik yollar üzerine SCCA1'in olası etkilerini gösteren varsayımsal model	28
Şekil 3.1. SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor ve 5' UTR bölgelerinin amplifikasyonu ve DNA dizi analizi için kullanılan primerlerin gösterilmesi.	33
Şekil 3.2. SCCA1 geninin promotor bölgesi üzerinde primerlerin ve <i>A/w26I</i> restriksiyon enziminin tanıma bölgesinin gösterilmesi	36
Şekil 3.3. SCCA2 geni promotor bölgesi üzerinde primerlerin ve <i>BsaI</i> restriksiyon enziminin tanıma bölgesinin gösterilmesi.	38
Şekil 3.4. SCCA1 geni ekzon 6,7 ve 8 bölgeleri ve amplifikasyonda kullanılan primerlerin gösterilmesi.	41
Şekil 4.1. SCCA1 geninde bulunan polimorfizmler	46
Şekil 4.2. SCCA2 geninde bulunan polimorfizm	47
Şekil 4.3. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 1 (Pol1).	49
Şekil 4.4. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 2 (Pol 2).	50
Şekil 4.5. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 3 (Pol 3).	51
Şekil 4.6. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 4 (Pol 4).	52

- Şekil 4.7.** SCCA1 promotor bölgesinde homozigot olarak saptanan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) birlikte kalıtıldığını gösteren DNA dizi analiz sonucunun gösterilmesi. 53
- Şekil 4.8.** SCCA1 promotor bölgesinde heterozigot olarak saptanan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) birlikte kalıtıldığını gösteren DNA dizi analiz sonucunun gösterilmesi. 54
- Şekil 4.9.** SCCA1 promotor bölgesinde bulunan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) beraber kalıtıldığını ve SCCA1 genine özgül olduğunu gösteren DNA dizi analiz sonucu. 55
- Şekil 4.10.** SCCA2 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 5 (Pol 5). 56
- Şekil 4.11.** SCCA1 geni ekzon 1’de bulunan Polimorfizm 6 (Pol 6). 57
- Şekil 4.12.** SCCA1 geninin promotor bölgesi üzerinde primerlerin ve *A/w26/* restriksiyon enzimin kesim sonucunun gösterilmesi. 59
- Şekil 4.13.** SCCA2 geni promotor bölgesi üzerinde primerlerin ve Bsal restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve enzim kesim sonucunun gösterilmesi. 61
- Şekil 4.14.** SCCA1 geni 6,7 ve 8. ekzon bölgeleri ve RT-PZR’de kullanılan primer çiftleri şekil üzerinde gösterilmiştir. 63
- Şekil 4.15.** SCCA1 geni ekzon 6,7 ve 8 bölgeleri, bu bölgelerin RT-PZR’sinde kullanılan primerler ve eozinofillerde SCCA1 genine ait RT-PZR sonucunun gösterilmesi. 64
- Şekil 4.16.** SCCA1 proteinin Western Blot tekniğiyle gösterilmesi 65
- Şekil 4.17.** SCCA1 proteininin hücre ölümü üzerine olan etkisinin gösterilmesi 66
- Şekil 4.18.** SCCA1’in A549 hücrelerinde, uyarılmamış, NE ile uyarılmış ve IL-4, IL-13 ile uyarılmış koşullarda Muc5AC geni ifadesi üzerine etkisinin gösterilmesi 68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor ve ekzon bölgelerinde bulunan polimorfizmler.	47
Çizelge 4.2. Sağlıklı, astımlı, atopik astımlı ve atopik olmayan astımlı bireylerde SCCA1 genotip dağılımı	60
Çizelge 4.3. Sağlıklı, astımlı, atopik astımlı ve atopik olmayan astımlı bireylerde SCCA2 genotip dağılımı	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

7-AAD	:	7-Amino Aktinomisın D
A549	:	Akciğer epitel hücre hattı
AD	:	Atopik Dermatit
BAL sıvısı	:	Bronş Alveolar Lavaj sıvısı
bç	:	Baz çifti
BEAS 2B	:	Bronş epitel hücre hattı
BHR	:	Bronş Aşırı Duyarlılığı
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	:	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
FITC	:	Floresin İzotiyosiyanat
Ig E	:	İmmünoglobülin E
IL-10	:	İnterlökin 10
IL-12	:	İnterlökin 12
IL-13	:	İnterlökin 13
IL-18	:	İnterlökin 18
IL-2	:	İnterlökin 2
IL-4	:	İnterlökin 4
IL-5	:	İnterlökin 5
IL-9	:	İnterlökin 9

INF- γ	:	İnterferon gama
JNK1	:	c-JUN NH ₂ – Terminal Kinaz
kDa	:	Kilodalton
MAPK	:	Mitojen- Aktive Protein Kinaz
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
μ l	:	Mikrolitre
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	:	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
MUC	:	Musin
NaCl	:	Sodyum Klorür
NK	:	Doğal Katil Hücreler
PAGE	:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBMS	:	Peripheral Kan Mononükleer hücreler
PMN	:	Polimorfonükleer hücreler
PVDF	:	Polyvinylidene Fluoride
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	:	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
RNA	:	Ribonükleik Asit
Rpm	:	Dakikadaki dönüş
RT-PZR	:	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincire Reaksiyonu
SAPK	:	Stres-Aktive Protein Kinaz

SCCA1	:	Skvamoz Hücre Kanseri Antijeni 1
SCCA2	:	Skvamoz Hücre Kanseri Antijeni 2
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
STAT 6	:	Sinyal İletici Ve Transkripsiyon Uyarıcı Yol 6
TBE	:	Tris-Borik Asit-EDTA
TE	:	Tris-EDTA tamponu
Th1	:	T yardımcı hücre 1
Th2	:	T yardımcı hücre 2
TNF- α	:	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
UTR	:	Translasyona Uğramayan Bölge
UV	:	Mor tesi

1.GİRİŞ

Astım, hava yollarının artmış duyarlılığı ve hava yollarındaki daralma ile tanımlanan, çocukluk çağının en sık rastlanan kronik hastalığıdır. Yalnızca çocukluk çağında değil, aynı zamanda farklı yaş grubundaki tüm insanları etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Tüm dünyada bu hastalıktan etkilenen 300 milyon kişinin olduğu rapor edilmiştir. 2025 yılında 100 milyon astımlı hastanın daha bu sayıya ekleneceği öngörülmektedir (GINA 2009).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 23 milyon insanın astım hastası olduğu ve bu sayının 7 milyonunu çocukların oluşturduğu bildirilmiştir (American Lung Association 2010 verilerinden alınmıştır). Hastalığın dünya çapında yaygınlığı, farklı ülkelerdeki populasyonlarda %1' den %18'e kadar değişebilmektedir (GINA, 2009). Ülkemizde değişik bölgelerde yapılan çalışmalarda ise astım prevalansı, çocuklarda % 0,7-14,8 erişkinlerde ise % 0,3 -7,6 arasında bulunmuştur (Çelik, 2004).

Astım hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır ve çeşitli faktörler astım gelişiminde ve astımlı bireylerin hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasında rol oynayabilmektedir. Bu faktörleri, bireysel (temelde genetik faktörler) ve çevresel faktörler olarak iki ana grup altında toplamak mümkündür.

Çevresel faktörler kendi içerisinde; allerjenler, inflamasyon, çalışma ortamının oluşturduğu tetikleyiciler, sigara içimi, hava kirliliği ve diyet şeklinde alt başlıklara ayrılabilir. Her bir alt başlığı da kendi içerisinde yeni alt başlıklara ayırmak mümkündür. Örneğin allerjenler; ev içi (akar, kedi-köpek gibi kürklü hayvanlar, maya, mantar, küf alerjileri gibi) ve ev dışı (polenler, küf, maya) biçiminde gruplandırılabilir (Wahn et al., 1997; Sporik et al., 1990; GINA, 2009).

Astımı etkileyen bireysel faktörleri; genetik faktörler, obezite ve cinsiyet olarak üç başlık altında toplamak mümkündür.

Obezite astımda bir risk faktörü olarak ele alınmaktadır ve leptin gibi bazı aracılar, hava yolu fonksiyonuna ve astım gelişimi olasılığını artırmaya etki edebilir (Beuther et al., 2006).

Bireysel faktörler olarak ele alınan diğer bir faktör cinsiyettir. 14 yaşın altındaki çocuklarda; erkeklerde astım görülme sıklığı kızlara göre iki kat fazladır. Yaş ilerledikçe aradaki fark kapanmaktadır ve yetişkin dönemde kadınlarda erkeklere göre astım görülme sıklığı daha fazladır (Harwood et al., 1985).

Doğumda, erkeklerde akciğer büyüklüğü kızlara göre daha az olmasına karşın erişkin dönemde akciğer büyüklüğü erkeklerde daha fazladır ve bu iki cinsiyet arasında astım sıklıkları arasındaki farkı açıklamada yardımcı olabilir (Martinez et al., 1995). Cinsiyetin astım üzerine etkisi net olarak görülmekle birlikte bunun nedenleri üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Astımı etkileyen bireysel faktörler arasında üçüncü faktör ise bireylerin kalıtsal yapısıdır. Astım hastalığının kalıtsal bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir, buna karşın sadece genetik faktörler ile astımın açıklanması son derece güçtür. Ailede astımdan etkilenmiş bir bireyin bulunması astıma yakalanma riskini iki kat artırmakta iken, ailede iki kişinin hasta olması ise risk faktörünü dört kat artırmaktadır (London et al., 2001). Diğer yandan, birbirine genetik olarak yakın olan Hong Kong ve Çin'de yaşayan kişilerde astım ve allerji sıklıkları son derece farklıdır (ISAAC., 1998). Bu nedendir ki astım hastalığı genetik ve çevresel faktörlerin birbirleriyle sürekli etkileşimi sonucunda ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır.

Aile ve vaka-kontrol ilişkisi çalışmaları, astıma yatkınlıkla ilgili çok sayıda kromozomal bölgeyi tanımlamıştır. Bağlantı analizi, pozisyonel klonlama çalışmaları, kapsamlı genom ilişkilendirme çalışmaları ve aday gen yaklaşımları ile astım hastalığında rol oynayan çok sayıda gen bulunmuştur. Bu genlerin astımda oynadıkları rol ya da roller daha ileri mekanizma çalışmaları ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Postma and Koppelman, 2009; Mutius, 2009).

Serin proteaz inhibitörleri (serpin) farklı fonksiyonlara sahip homolog proteinlerdir. Bu protein ailesi, kan pıhtılaşması, fibrinin parçalanması, programlı hücre ölümü (apoptoz), gelişim ve yangı (inflamasyon) gibi birçok önemli hücreysel olayda görev alır. Günümüze kadar hayvan, virüs ve bitkilerde, moleküler ağırlığı 40-45 kDa arasında olan yaklaşık 500 serpin tanımlanmıştır. Prokaryotlarda da benzer yapılar gösterilmiştir. Serpinlerin yaklaşık 600 milyon yıllık bir zaman diliminde farklılaştıkları düşünülmektedir. Serpinlerin sınıflandırmasında ekzon-intron

bağlantı bölgelerindeki değişiklikler ve protein yapıları kullanılabilir. Bilinen serpin genlerinin çoğunda kodlanmayan birinci ekzon ve bir kısmı kodlanan son ekzon bulunmaktadır (Van Gent, 2003).

SCCA proteini ilk olarak rahim ağzı Skuamoz Kanserli Hücrelerde (SCC) tanımlanmış ve daha sonra baş-boyun, akciğer ve özafagus kanserlerinde de serumda seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Kato and Torigoe, 1977; Duk et al., 1990; Bolli et al., 1994). Hastalığın şiddeti ile birlikte serumdaki protein seviyesi yükselmektedir. İlaç tedavisi ya da cerrahi olarak tümörün çıkarıldığı durumlarda serumdaki SCCA protein seviyeleri düşmektedir; buna karşın tekrar tümör gelişimi durumunda protein seviyesi artmaktadır. Serum seviyesinin hastalık şiddeti ve varlığı ile bağıntılı olması SCCA'yı iyi bir tümör belirteci (markeri) yapmıştır.

SCCA proteini ile yapılan deneyler, bu proteinin asidik ve nötral formda iki proteinden oluştuğunu göstermiştir. Skuamoz Hücre Kanseri Antijen 1 (SCCA1) ve Skuamoz Hücre Kanseri Antijen 2 (SCCA2) proteinleri serpin protein ailesinin üyeleridir. Birbirlerine amino asit seviyesinde %92 benzerlik gösteren bu iki gen 18. kromozomun uzun kolunda (18q) yerleşim gösterir (Schneider et al., 1995).

Nötral formda olan SCCA 1 proteini; Katepsin K, Katepsin L ve Katepsin S sistein proteazlarının inhibitörüdür. SCCA1 proteini normal dokularda ve tümör dokularında ifade olur. Asidik formda bulunan SCCA2 proteini ise Katepsin G ve mast hücre kimazı'nı inhibe eden bir serin proteaz inhibitörüdür ve çoğunlukla tümör dokularında ifade olur (Çataltepe et al., 2000). SCCA proteinlerinin kanser dışında atopik dermatit, sedef hastalığı ve bronşial astım gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda ifadesinin arttığı rapor edilmiştir (Campbell and De'Ambrosis, 1990; Molina et al., 1990).

Yardımcı T hücre 2 (T helper 2) tip yanıtın astımda aktive olduğu ve bu hücrelerden salınan IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin astım patolojisinde önemli rol oynadığı birçok çalışma tarafından desteklenen bir bulgudur (Hahn et al., 2003). IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin önemli bir etkisi de bronş epitel hücrelerinin çoğalmalarını ve Th2 tip sitokin sentezini artırmaktır. Yuyoma ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yayınlanan bir makalede IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile uyarılan insan bronş hücrelerinde mikroarray teknolojisi kullanarak gen ifade profillerine bakılmış; SCCA1 ve SCCA2 genlerinin ifadesinin yaklaşık 20 kat arttığı

rapor edilmiştir. Mikroarray sonuçları gerçek zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincire Reaksiyonu (RT-PZR) kullanılarak kontrol edilmiş ve sonuçlar doğrulanmıştır (Yuyama et al., 2002).

SCCA1 ve SCCA2 proteinleri iyi bir tümör belirteci olmalarıyla birlikte tümör hücrelerini apoptozdan korumak ve NK hücre göçünü engelleme gibi farklı hücresel yollar üzerinde de etkilidir. SCCA proteinlerinin astım patolojisi üzerinde etkili olabileceğine dair kanıtlar olmakla birlikte bu konudaki bilgiler son derece kısıtlıdır.

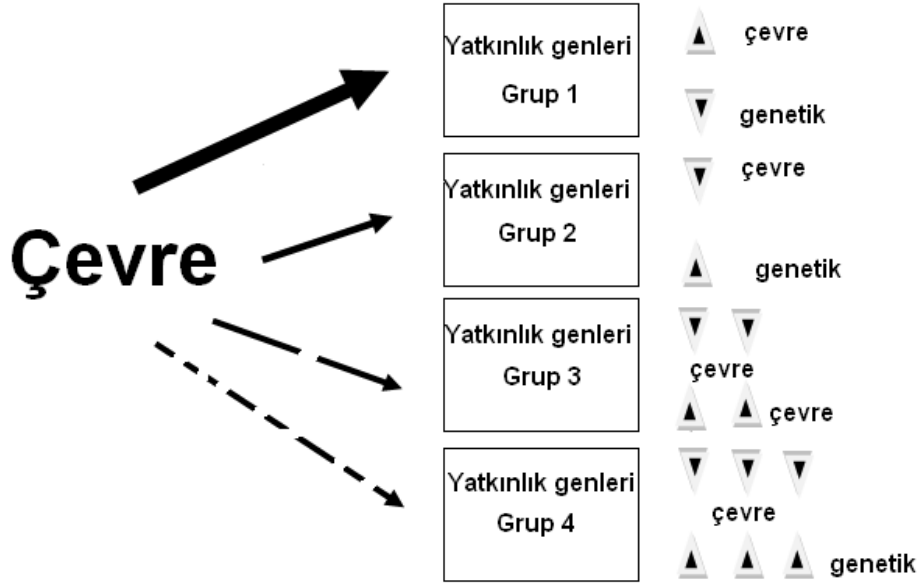
Bu tez çalışmasında DNA Dizi Analiz yöntemi kullanılarak SCCA1 ve SCCA2 genindeki varyasyonların astım fenotipleri ile ilişkisi incelenmiştir. Astım grubu içerisinde bulunan atopik ve atopik olmayan astımlılar ayrı ayrı değerlendirilerek bulunan varyantların atopi ile ilişkisine bakılmıştır.

SCCA1 proteinin akciğer epitel hücrelerinde hücre ölümü (olası apoptoz) ve mukus salgınımı üzerine olan etkileri hücresel düzeyde incelenmiştir. Astım patogenezinde önemli rolü olan eozinofillerde bazal düzeyde ve sitokinle uyarılmış düzeyde SCCA1 ifadesine RT-PZR tekniği kullanılarak bakılmıştır.

2.GENEL BİLGİ

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı geri dönüşümlü hava yolu tıkanması (obstrüksiyonu), bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu yangısı ile karakterize bir hastalıktır (Bocher et al.,1994; Vignola et al., 1998).

Astım, tek bir gendeki değişikliğin hastalığın gelişiminin tamamını ya da büyük bir kısmının açıklanabildiği Huntington, Kistik fibroz ve Talasemi gibi tek gen hastalıklarından farklı olarak; çok sayıda genin rol oynadığı bir hastalıktır. Bu genlerin her biri birlikte iş yaparak ya da çevresel uyarılarla etkileşime girerek astım gelişimine katkı sağlar (Şekil 2.1) (Postma and Koppelman, 2009).



Şekil 2.1. Astım gelişiminde rol oynayan gen-gen ve gen-çevre etkileşimi (Postma and Koppelman, 2009'dan alınmıştır).

Farklı yaş gruplarında astım hastalığının gelişimi ve astımlı hastalarda görülen değişik klinik bulgular; hastalığın tek bir hücreyel yol yerine birçok hücreyel yolun görev aldığı karmaşık yapısının olduğunu göstermektedir. Bu yollar üzerinde görevli çok sayıda gen, küçük etkiler göstererek hastalığın gelişimine katkıda bulunmaktadır (Mutius, 2009).

Böyle karmaşık bir yapı söz konusu olduğunda klasik hastalık yaklaşımlarıyla astıma yol açan faktörlerin ortaya konulması mümkün görünmemektedir. Astım genetiği çalışmalarının, hastalığın ve fenotiplerinin tanımlanması ile birlikte hastalığın tedavisindeki güçlükleri çözmede de faydalı olacağı düşünülmektedir (Postma and Koppelman, 2009).

2.1. Astım Genetiği

Yeni ve etkili genetik araçların günümüzde kullanılmalarıyla birlikte astımın kalıtsal bileşenleriyle ilgili çalışmalar ve buna karşı ilgi giderek artmaktadır. Bu olağanüstü teknolojik ilerlemeler, DNA'daki baz çiftlerinin dizilimindeki değişikliklerin tanımlanmasına, astımın altında yatan biyolojinin daha iyi anlaşılmasına ve hastalığın gelişimine yol açan ve şimdiye kadar bilinmeyen olayların keşfine yardımcı olabilir. Yukarıda sözü edilen beklentilerin sağlanması amacıyla, linkaj - pozisyonel klonlama çalışmaları, genom kapsamlı ilişkilendirme çalışmaları ve aday gen çalışmaları gibi genetik yaklaşımlar astımla ilişkili genlerin bulunması amacıyla kullanılmaktadır (Weiss et al., 2009; Postma and Koppelman, 2009).

2.1.1. Bağlantı (Linkaj) ve Pozisyonel Klonlama Çalışmaları

Linkaj çalışmalarının temelini astımdan etkilenen bireylere sahip geniş aileler oluşturmaktadır. Tüm kromozomları kapsayan aralıklı genetik markerler kullanılarak bir ailedeki astımlı bireyler arasında, beklenenden daha yüksek sayıda ortak allelleri taşıyan genetik bölgelerin taraması yapılmaktadır. Böyle bir bölgenin tanımlanması, bu genomik aralıklar içinde bir yerde hastalığa yatkınlık allelinin bulunduğunu göstermektedir. Bu bölge içerisindeki genler, pozisyonel klonlama çalışmalarıyla daha ileri düzeyde araştırılmakta ve çalışmalar hastalık ilişkili gen/genler bulunana kadar devam etmektedir (Mutius, 2009).

Pozisyonel klonlama çalışmaları, aday gen/genler veya bölgeler ile ilgili ön bir hipotez olmaksızın yapılan aile çalışmalarında kullanılmaktadır. Markerler, tüm genom boyunca rastgele dağılmıştır ve hastalık fenotipi ile bağlantısı test edilmektedir. Genetik markerlerin uç uca aralıklı kullanımı ile bağlantıya neden olan asıl gen tespit edilir. Bu oldukça zahmetli ve zaman isteyen bir yaklaşımdır. Bu güne kadar astımla ilişkili yedi gen pozisyonel klonlama ile bulunmuştur. Bu

genler; DPP10 (dipeptidil peptidaz 10), CYF1P2 (sitoplazmik fragil X mental retardasyon protein (FMRP) ilişkili protein 2), GPRA (NPSR1= nöropeptid S reseptör 1), HLAG (Histokompatibilite antijen sınıf I), SFRS8 (Arjinin/ Serin Zengin-Splaysing faktör 8,), PHF11 (PHD Finger Protein 11) ve ADAM33 (Disintegrin metalloproteinaz 33) genleridir. Bu genlerin bir çoğu değişik çalışmalarda doğrulanmış ve bu genlerdeki tek nükleotit polimorfizmleri astımla ilişkilendirilmiştir (Postma and Koppelman 2009; Mutius, 2009; Kumar and Ghosh, 2009).

2.1.2. Genom-Kapsamlı İlişkilendirme Çalışmaları

Genom-kapsamlı ilişkilendirme çalışmalarının önemi tam olarak yeni hastalık genlerinin keşfine olanak sağlamasından kaynaklanmaktadır. Astım için yakın zamanda yapılan genom-kapsamlı ilişkilendirme çalışmasında, aile ve vaka kontrol panelleri kullanılarak karakterize edilmiş 994 çocuk astımlı hastada ve 1243 astımı olmayan kontrolde 317,000 tek nükleotit değişikliği DNA'da araştırılmıştır. Kromozom 17q21.1 üzerinde birçok marker çocukluk çağı astımı ile kuvvetli biçimde ilişkilendirilmiştir. Bu ilişkilendirme sonucu, birbirinden bağımsız olarak 2320 Alman çocukta ve 1958 doğumlu 3301 İngiliz bireyde tekrar edilmiştir. Yapılan bu geniş kapsamlı çalışmalar sonucunda ORMDL3 genindeki SNP ile çocukluk çağı astımı arasında bir ilişki tespit edilmiştir (Moffatt et al., 2007).

2.1.3 Aday Gen Çalışmaları

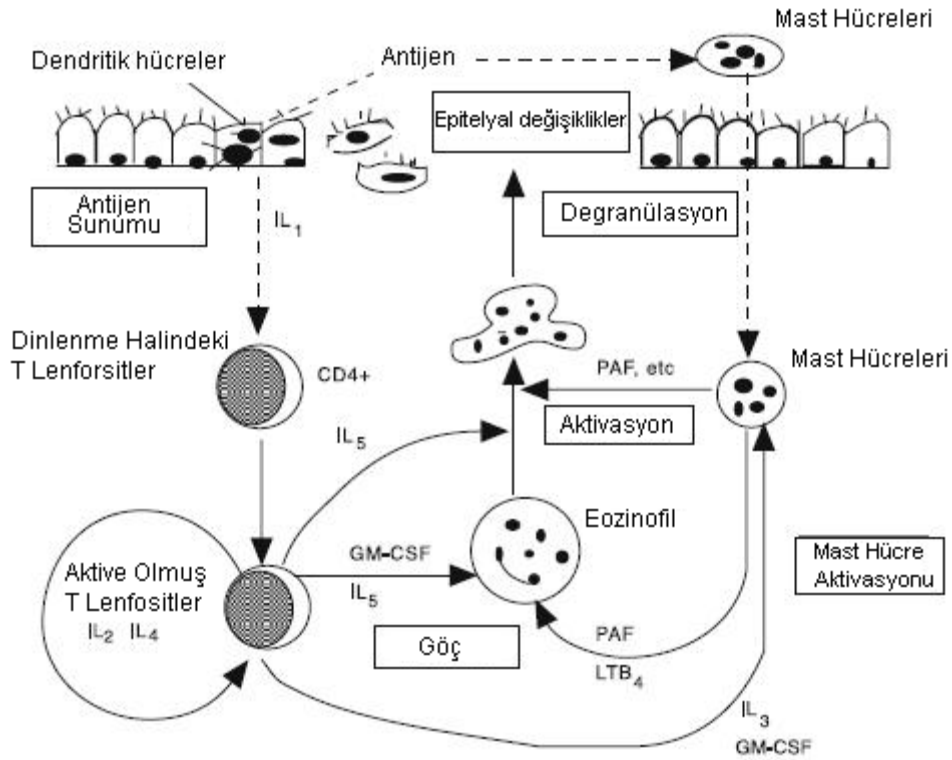
Bugüne kadar farklı populasyonlarda birçok aday gen çalışması yapılmıştır. Astımla ilişkilendirilen bu genler temel olarak 4 ana grup altında toplanabilir (Vercelli, 2008)

- a) Doğuştan immünite ve immün düzenlenme ile ilgili genler
- b) Th2- hücre farklılaşması ve efektör fonksiyonları ilgili genler
- c) Epitel hücre biyolojisi ve mukozal immünite ile ilgili genler
- d) Akciğer fonksiyonu, havayolu yeniden yapılanması (remodelling) ve hastalık şiddeti ile ilgili genler.

2006 yılında Ober ve Hoffjan, astım ve atopi ile ilişkili 118 genin 492 yayında gösterildiğini rapor etmişlerdir (Ober and Hoffjan, 2006). 2009 yılında Scott T. Weiss, astım fenotipiyle ilişkili olan ve en az iki kere tekrar edilmiş; örnek sayısı 300'den (150 hasta ve 150 kontrol) daha büyük olan çalışmasında 43 genin astımla ilişkili olduğunu göstermiştir (Weiss et al., 2009).

2.2. Astım Patolojisinde Rol Oynayan Hücresel Yollar

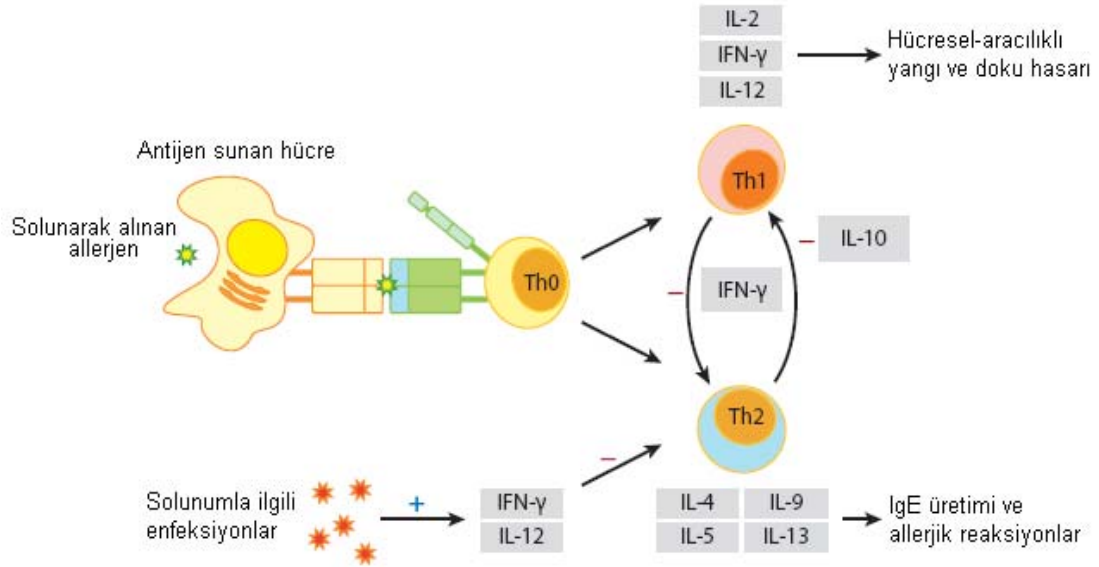
Astımda allerjenlere karşı immün ve inflamatuvar cevapta T hücreleri, eozinofiller, mast hücreleri, nötrofiller ve epitel hücrelerinin de yer aldığı birçok hücre görev almaktadır (Larche et al., 2003) (Şekil 2.2). Astım patogenezinde temel efektör hücreler eozinofillerdir, ancak inflamasyonunun yönlendirilmesini T-yardımcı (T-helper:Th 2) hücreler gerçekleştirir.



Şekil 2.2. Astım patolojisinde görev alan hücreler ve birbirleriyle olan etkileşimleri (Arnaldo, 2008' den alınmıştır).

T Lenfositler saldıkları değişik sitokin profillerine göre Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt gruba farklılaşabilir (Mosmann et al.,1986). Ağırlıklı olarak interferon (IFN)- γ ve

IL-2 salıveren Th1 hücreleri geç tip aşırı duyarlılık ve fagosit bağımlı hücre savunmasında görev alırken (Mosmann et al., 1986; Yamamura et al., 1991); Th2 hücreleri astım gibi allerjik hastalıklarda rol alıp, ağırlıklı olarak IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13 gibi allerjik inflamasyonu yöneten sitokinleri salıverirler (Şekil 2.3).

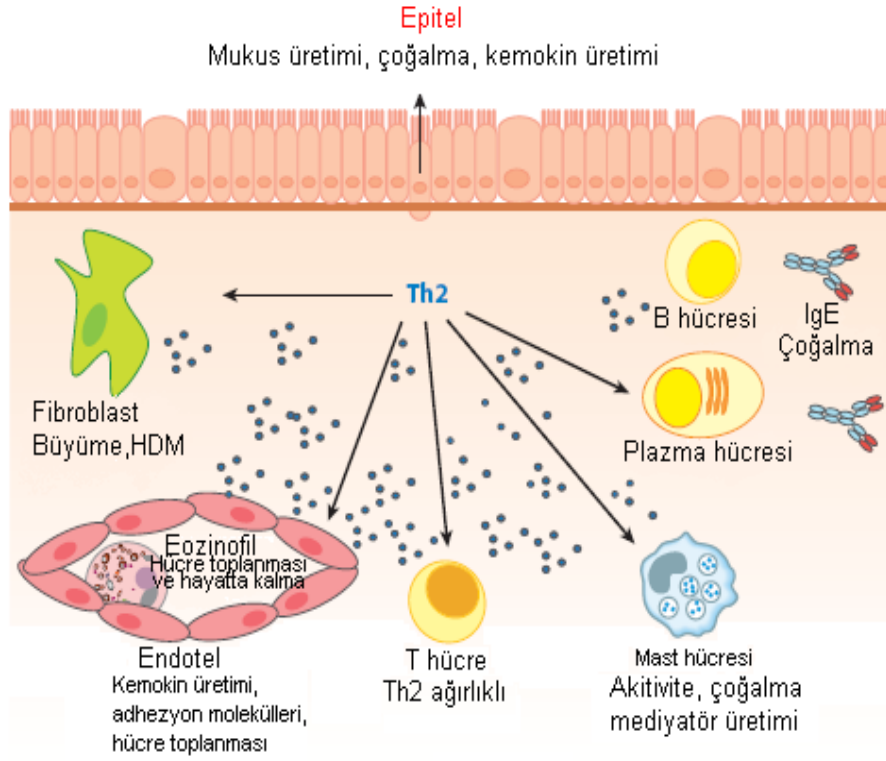


Şekil 2.3. T yardımcı hücrelerin farklılaşması ve sentezledikleri sitokinler (Hamid and Tulic, 2009'dan alınmıştır).

T lenfositler, salgıladıkları çok çeşitli sitokinler aracılığıyla hava yollarında eozinofillerin infiltrasyonu ve mast hücrelerinin uyarılarak farklı aracılardan salınmasında rol oynarlar. Th2 tip lenfositlerden salınan IL-4 ve IL-13, B hücrelerini aktive ederek IgE ve IgG4 sentezini indüklerken IL-5 ise eozinofil farklılaşmasını (fare modelinde) ve aktivasyonunu sağlar (Mould et al., 2000). Th2 hücrelerinden salınan sitokinler IgE sentezini artırmalarından başka, başta eozinofiller olmak üzere inflamatuvar hücrelerin hava yollarına birikmesine ve hava yolu inflamasyonunun gelişmesine neden olan mekanizmaları harekete geçirirler.

Kırk bir atopik, on dokuz atopik olmayan çocuk üzerinde yapılan bir araştırmada periferik kan mononükleer hücrelerinin antijenle uyarılması sonucu uyarı yapılan antijene duyarlı atopik grupta IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi Th2 sitokinlerin daha yüksek düzeyde salındığı, atopik olmayan grup ve uyarı yapılan allerjene duyarlı

olmayan atopik grupta ise bu sitokinlerin düşük düzeyde salındığı gözlenmiştir. Böylelikle atopik hastalıklarda Th2 lenfositlerin aktive olarak IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13 salgıladıkları görüşü kuvvetle desteklenmiştir (Jenmalm et al., 2001). Şekil 2.4'te Th2 tip sitokinlerin astımda etkili olan hücreler üzerindeki muhtemel rolleri gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Astımda rol oynayan hücreler ve onların salgıladıkları sitokinlerin olası görevleri şekil üzerinde gösterilmiştir. Kısaltmalar; HDM: Hücre dışı matriks, IgE, Immünoglobülin E. (Hamid and Tulic, 2009'dan alınmıştır).

2.2.1. Th2 Lenfositler ve Sitokinleri Astım Patogenezi Üzerine Olan Etkileri

Th2 tip lenfositlerin astımda aktive olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Wong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 41 allerjik astımlı ve 30 sağlıklı bireyin serumlarında IL-10, IL-12, IL-13 ve IL-18 düzeylerine bakılmış ve allerjik astımlı grupta bunların seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Wong et al., 2001). Robinson ve arkadaşlarının çalışmasında, atopik astımlı hastaların BAL sıvılarında IL-3, IL-4, IL-5 ve GM-CSF mRNA ifadesine bakılmış ve sağlıklı bireylerle

karşılaştırıldığında ifade düzeyinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Robinson et al., 1992).

Astımda Th2 sitokinlerinin bölgesel artışını kanıtlayan veriler BAL sıvıları ve indüklenmiş balgam örnekleriyle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Walker ve arkadaşları, BAL sıvısındaki T hücre aktivasyonu ve eozinofili ile astım şiddeti arasında ilişki bulmuştur (Walker et al., 1991).

Sistemik olarak, akut ataktaki ağır astımlı hastaların serumlarında; lokal olarak ise allerjen provokasyonu sonrası BAL sıvılarında IFN- γ düzeyinde artış olduğu, astımlı hastaların hava yollarından elde edilen allerjen özgün T hücre klonlarının ise IL-4 ile birlikte IFN- γ saldıkları çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır (Corrigan et al., 1990; Calhoun et al., 1992; Krug et al., 1996).

Bu sonuçlar, astımda Th2 tip sitokin yapımının hakim olmasıyla beraber, genel bir T hücre aktivasyonunun varlığını ortaya koymaktadır.

2.2.2. IL-4 ve Özellikle IL-13 Astım Patogenezinde Rol Alan En Önemli Sitokinlerdendir

Th2 tip hücrelerinden salınan sitokinlerden olan IL-4 ve IL-13'ün astımda önemli rol oynadıkları yaygın olarak kabul edilmiş ve desteklenmiş bir bulgudur.

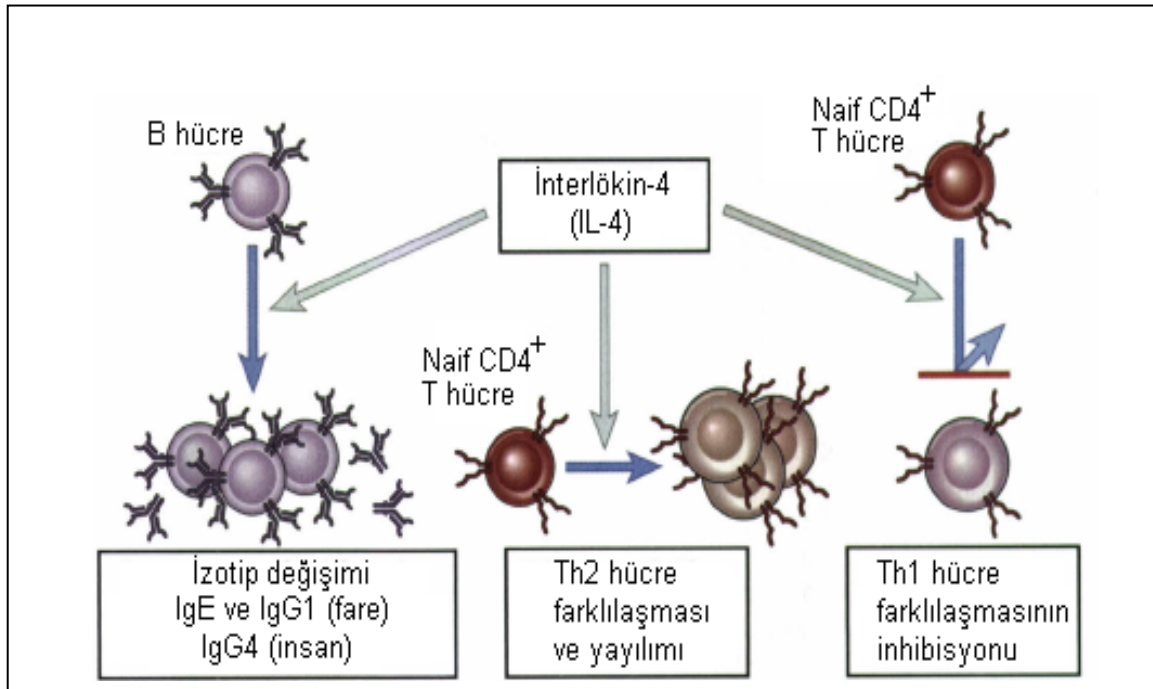
IL-4 sitokini, IgE antikorunun üretimini ve naif CD4⁺ yardımcı T hücrelerinden Th2 hücrelerinin gelişmesini sağlayan esas uyarandır. IL-4'ün temelde hücrel kaynağı CD4⁺ T lenfositlerle birlikte aktive olmuş mast hücreleridir. Bu iki hücre dışında IL-4, bazofil hücreleri, doğal katil hücreler (Natural Killer Cell) ve eozinofil hücreleri tarafından da salınır.

Lenfoid hücrelerdeki IL-4 reseptörü, diğer sitokin reseptörlerinde de ortak olan Yc zinciriyle ilgili, tip I sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olan sitokin bağlama zincirinden oluşmaktadır. Bu IL-4R α reseptörü, Jak-STAT yoluyla (Jak3 ya da 4 – STAT-6) iletimi sağlar ve bu yolak IRS2 olarak bilinen insülin reseptör cevap substratına (insulin response substrate) ihtiyaç duyar. IL-4 STAT-6 proteini vasıtasıyla, Th2 farklılaşması ve B hücrede IgE dönüşümü gibi işlevlerini

gerçekleştirir. STAT-6 proteini IL-4'ün birçok işlevini yerine getirirken gerekli olan genlerin transkripsiyonunu indükler (Abbas et al., 2007a).

Eozinofillerde ve bazofillerde IL-4, granül-bağlı peptid halindeki öncül yapıda allerjik reaksiyona karşı salınabilir. IL-4, B hücreleri tarafından MHC sınıf II B7 (CD80/CD86), CD40, yüzey IgM ve düşük afiniteli IgE reseptör (CD23) sentezlenmesini tetikler. IL-4 aynı zamanda IgM' den IgE' ye immünoglobülin izotip dönüşümünü uyarır (Coffman et al., 1986; Romagnani, 1990).

B hücreleri üzerindeki etkilerine ilave olarak IL-4 T lenfositlerin büyümesinde, değişiminde ve hayatta kalmasında önemli rol oynar. Doğal Th0 lenfositlerin Th2 lenfositlere doğru değişimlerini yönlendirir, makrofaj aktivasyonunu inhibe eder (Şekil 2.5) ve aynı zamanda T lenfositlerin apoptozunu engelleyerek allerjik immün yanıtın devam etmesinde de rol oynar (Vella et al., 1997; Enelow et al., 2004).



Şekil 2.5: IL-4'ün B ve T hücresi üzerine biyolojik olan etkisi gösterilmektedir (Abbas et al., 2007b'den alınmıştır).

IL-13 sitokini yapısal olarak IL-4 sitokinine benzerdir ve Th2 CD4⁺ T hücreleri ve bazı epitel hücreleri tarafından üretilir ve mononükleer fagositik hücreler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve B hücreleri üzerinde etkilidir. IL-13, IL-4'ün etkilerine benzer tarzda etki gösterir fakat T veya B hücreler üzerine olan etkisi IL-4'ten daha azdır (Abbaset al., 2007b., Adkinson 2008). IL-13'ün makrofajlar üzerindeki temel etkisi; makrofajların etkilerini inhibe etmektir ve interferon gama (INF- γ) ile antagonist olarak çalışır.

IL-13 allerjik inflamasyonda IL-4 ile birlikte çalışmakla birlikte. IL-4 ve IL-13 reseptörlerinin farklı dağılım motifi ve IL-4 ve IL-13'ün indüklenme ve kararlılığındaki (stabilitesindeki) farklılıklar bu iki sitokinin biyolojik etkilerinin farklı olabileceğini göstermektedir.

IL-13'ün sahip olduğu biyolojik etkiler maddeler halinde özetlenirse;

A) IL-13, kronik yangı durumundaki doku tamiri aşamasında fibrozisi ilerletir: IL-13 fibrogenik fonksiyonunu fibroblast ve makrofaj hücrelerinde kollojen sentezini uyararak gerçekleştirir.

B) IL-13 B hücrelerinde IgE değişimini uyarır: IL-4 ile bu özelliği paylaşır. IL-13 nakavt fareler IL-4 ürettikleri halde, IgE seviyeleri normal farelere göre düşüktür.

C) IL-13 akciğer epitel hücrelerinde mukus üretimini stimüle eder: Astım patogenezinde önemli bir yeri olan mukus üretimine IL-13'ün etkisi bronş epitelial goblet hücrelerinin çoğalma, farklılaşma ve salgılama özellikleri üzerine etki etmesi yoluyla olur.

D) IL-13, endotelial adezyon molekülünün (VCAM-1) ifadesinin indüklenmesi ve granülosit ve monositlerin doku içinde toplanmalarına aracılık eden kemokinler yoluyla yangıyı (inflamasyon) ilerletir: IL-13'ün yangıyı destekleyici etkisi parazit enfeksiyonlarına karşı destekleyici olabilir ancak astım ve diğer akciğer hastalıkları durumunda zararlıdır (Abbas et al., 2007b).

IL-13 ve IL-4'ün astım gelişimindeki rollerinin önemi anlaşıldıktan sonra etki mekanizmalarını anlamak amacıyla, IL-4 ve IL-13'ün ortak sinyal sistemi olan Sinyal İletici ve Transkripsiyon Uyarıcı Yol 6 (Signal Transducer and Activator of Transcription: STAT 6) araştırılmaya başlanmıştır. Foster ve arkadaşlarının normal

STAT-6 nakavt (STAT-6-/-) ve IL-4/IL-13 nakavt (IL-4-/- ve IL-13-/-) farelerle yaptığı çalışmada, ovalbumin sensitizasyonunun normal farelerde hava yolu yeniden yapılanmasına ve bronş aşırı duyarlılığına (BHR) yol açtığı; IL-4/IL-13-/- farelerde eozinofil birikiminin ve hava yolu yeniden yapılanmasının azaldığı, bronş aşırı duyarlılığının ise hiç gelişmediği gözlenmiştir (Foster et al.,2003).

STAT-6'yı sadece epitel hücrelerinde ifade eden farelerle yapılan bir çalışmada IL-13'ün epitel hücrelerine direkt etki ederek, STAT-6 sinyal sistemiyle, akciğer patolojileri oluşmaksızın bronş aşırı duyarlılığı ve mukus yapımını arttırdığı gözlenmiştir (Kuperman et al., 2002). IL-13'ün BHR üzerine inflamasyondan bağımsız etkisi Walter ve arkadaşlarının IL-13 -/- farelerde yaptıkları bir deneyde desteklenmiştir (Walter et al., 2001). Bu hayvanlarda ovalbumin ile uyarılma sonucu hava yolu inflamasyonunu oluşmasına rağmen BHR gelişmemiş ancak rekombinant IL-13 verildiğinde (rekonstitüsyon) allerjen bağımlı BHR yeniden gelişmiştir.

Özetle, bu çalışmalar sonucunda IL-13'ün hem inflamatuvar mekanizmaları harekete geçirdiği hem de bu etkiden bağımsız olarak hava yolu hücrelerine direkt etkisiyle bronş aşırı duyarlılığına sebep olduğu ortaya konmuştur.

İster STAT-6 bağımlı mekanizmalarla ister STAT-6 bağımsız mekanizmalarla olsun IL-13, BHR gelişmesinde anahtar rol oynar ve bu etkiyi oluşturmasında epitel hücreleri üzerine olan etkisi ön plandadır.

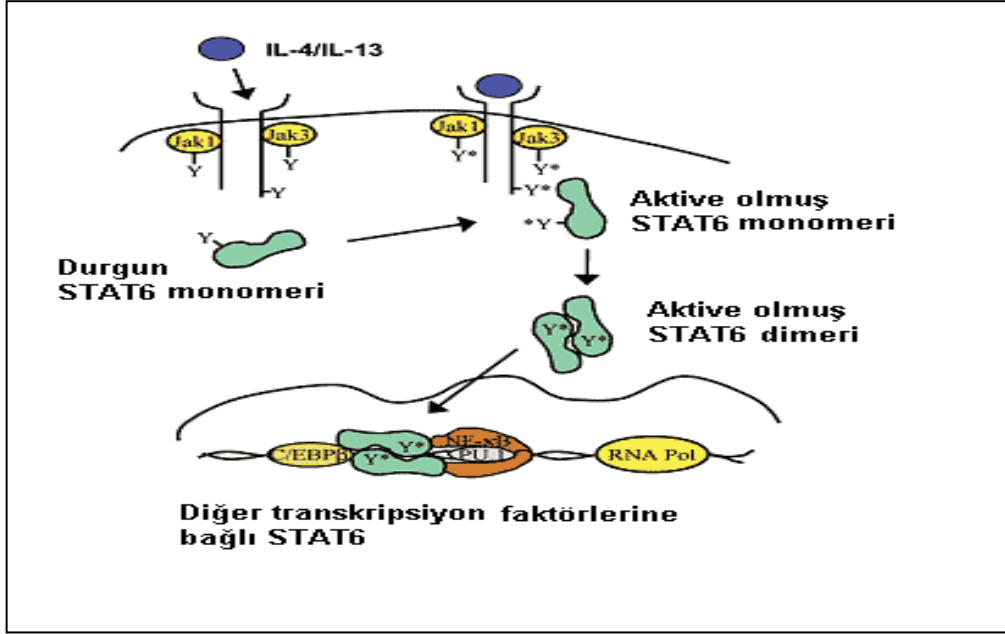
2.2.3. Astım Patolojisinde Bronş Epiteli - IL-4/ IL-13 Etkileşimi

STAT-6 yolu IL-4 ve IL-13'ün ortak sinyal sistemidir (Akimoto et al., 1998; Kuperman et al., 1998) (Şekil 2.6) ve hem sağlıklı bireylerde hem de astımlı hastalarda temel olarak bronş epitel hücrelerinde ifade olur. İmmünohistokimyasal çalışmalar STAT-6 İfadesinin en fazla bronş epitelinin silli silindirik hücrelerinde olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda mukus sentezleyen goblet hücrelerinin nükleer bölgesi civarında yüksek pozitif immün-aktivite bulunmuştur.

STAT-6 proteini, STAT-1, NFκB ve AP-1 gibi aktivitesi ve miktarı astımlı bronş epitelinde artan transkripsiyon faktörleriyle birleşmekte ve bu transkripsiyon faktörlerinin her birinin aktivitesi sitokin ve adezyon moleküllerinin ifadesinin

indüklenmesi süresince havayollarında yangıya yol açmada önemli katkıları bulunmaktadır.

STAT-6'nın yangıya yol açan işlevine ek olarak in-vivo çalışmalar STAT-6'nın mukus üretimini arttırmada önemli rol oynadığını göstermektedir (Kuperman et al., 1998). Goblet hücrelerinde immünohistokimyada gözlenen kuvvetli boyama da bu sonucu destekler niteliktedir (Mullings et al., 2001).



Şekil 2.6. STAT-6 proteininin IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile etkileşimi şekil üzerinde gösterilmektedir (Woisetschlaeger et al., 2002'den alınmıştır).

Tüm bu sonuçlara ilave olarak Mullings ve arkadaşları çalışmalarında STAT-6 ifadesini sağlıklı bireyler ve hafif astımlılarda benzer düzeyde bulmuşlar ancak; ağır astımlı hastalarda bu iki gruba göre belirgin olarak STAT-6 ifadesi bulunmuştur. Ağır astımlılarda gözlenen bu farkın STAT-6 ifadesinin astımın ağırlık derecesi ile ilgili olabileceği düşündürmüştür (Mullings et al., 2001).

IL-4 ve IL-13'ün bronş epiteline direk etki ederek astım fenotipi oluşturabileceğini destekleyen bir çalışmada, normal bireyler ve atopik astımlı hastalardan alınan örneklerden elde edilen primer bronş epitel kültürlerinin IL-4 ve IL-13 reseptörünü ifade ettikleri ve Der p I antijeni, IL-4 ve IL-13 ile ayrı ayrı stimüle edildiklerinde GM-CSF (astımlı ve normal bireylerde), IL-8 (astımlı ve normal bireylerde) ve TGF- α (astımlı bireylerde) sentezinin arttığı, bu artışın antijen+IL-4 veya

antijen+IL-13 ile stimölasyonla tek tek stimölasyondan daha yüksek olduğu saptanmıştır (Lordan, 2002). Bu alışmalar bronş epitelinin hem IL-4 ve IL-13 üreten bir kaynak; hem de IL-4 ve IL-13'ün hedefi olduğunu; IL-4 ve IL-13'ün epitel üzerine etkisinin hava yolunun yeniden yapılanmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak IL-4 ve IL-13 astımda çok önemlidir. Bu iki sitokinle ilgili bilinenlere karşın hem aydınlatılmamış taraflar, hem de çelişkili bilgiler vardır. Özellikle IL-4 ve IL-13'ün bronş epiteli üzerine direk etki yapabilmesinin mekanizması henüz bilinmemektedir.

2.3. IL-4 ve IL-13 İnsan Bronş Epitel Hücresinde Skuamoz Hücre Kanseri Antijeni (Squamous Cell Carcinoma Antigen: SCCA) Olan SCCA1 (SERPİNB3) ve SCCA2 (SERPİNB4)'nin Gen İfadesini 20 Kat Arttırmaktadır

Bronşial astım, IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin önemli rol oynadığı havayolu yangısı ile karakterize edilmiş karmaşık bir hastalıktır. Yuyama ve arkadaşlarının çalışmasında IL-4 ve IL-13'ün bronşial astım ve insan havayolu epitel hücrelerine olan etkisini araştırmak için üç farklı bireyden insan bronş epitel hücreleri alınmış ve bu hücreler IL-4 ya da IL-13 sitokinleriyle 24 saat süreyle uyarılmıştır. Uyarı sonunda bu hücrelerdeki gen ifadesi değişiklikleri mikroarray (micro-arrays: mikro-ip) analiz yöntemi kullanarak araştırmışlardır (Yuyama et al., 2002).

IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile uyarı sonucunda 2 kattan daha fazla ifade değişikliğinin görüldüğü genler çalışmaya dahil edilmiştir. IL-4 ile uyarı sonucunda 3 farklı hücre kültüründe sırasıyla 46, 46 ve 76 genin ifadesinde; IL-13 ile uyarı sonucunda ise 47, 63 ve 49 genin ifadesinde değişiklik gözlenmiştir. Bu genler içinde hem IL-4 hem de IL-13'ün iki kat değişikliğe yol açtığı ve aynı zamanda üç kültürün en az ikisinde değişikliğin gözlendiği on iki gen bulunmuştur. Bu genler arasında en fazla ifade artışının gözlendiği (~20 kat) genler serin proteaz inhibitör (serpin) ailesinden SCCA1 (SERPİNB3) ve SCCA2'dir (SerpınB4). Mikroarray sonuçları, Kantitatif (Gerçek zamanlı) Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile kontrol edilmiştir. SCCA1 ve SCCA2'de transkripsiyon düzeyinde altıncı saatte yükselme olmuş, 48 saat boyunca bu yükseliş devam etmiştir. Bu alışmada IL-4 ve IL-13'ün SCCA proteinlerini indüklemesinde rol oynayan sinyal mekanizmaları

da araştırılmıştır. Aktif STAT-6 ile transfekte edilmiş bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) 4-hidroksitamoksifen ile uyarıldığında SCCA1 ve SCCA2 ifadesinde artış olduğu; ancak bu artışın IL-4 ve IL-13'ün oluşturduğu SCCA artışından daha az miktarda olduğu gözlenmiştir. SCCA1 ve SCCA2 ifadesinde STAT-6 transkripsiyon faktörü ile birlikte diğer transkripsiyon faktörlerinin de gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Astımı olmayan atopik bireyler ve astımlılardan alınan bronş biyopsilerinden yararlanılarak oluşturulan cDNA kütüphanelerinden alınan örneklerle yapılan çalışmaların sonucunda astımlı hastalarda normallerden daha yüksek oranda SCCA ilişkili klonun bulunduğu saptanmıştır.

Kantitatif RT-PZR yöntemiyle inceleme yapıldığında, astımlı hastalardan alınan bronş epitel hücre kültürlerinde IL-13 ve IL-4 stimülasyonu ile SCCA1 ve SCCA2 gen ifadesinde artış saptanırken, TNF- α stimülasyonu benzer bir artışa yol açmamıştır. Yani bu artış genel bir proinflamatuvar etkinin sonucu değil, IL-4 ve IL-13'e özgü bir etkidir. Bunu destekleyen diğer bir bulgu da; SCCA1 ve SCCA2'yi tanıyan monoklonal antikörlerle yapılan immünohistokimyasal analizlerde bronş epitel hücrelerinin ancak IL-4 veya IL-13 ile stimüle edildiğinde SCCA1 ve SCCA2 proteinini sentezlediklerinin gösterilmesidir. Stimülasyonun 24. saatinde hücre içi SCCA ifadesinde artış olduğu ve daha sonra hafifçe artmaya devam ettiği; SCCA sekresyonunun ise 24. saatte saptanamadığı ancak 48. saatte ortaya çıkıp plato çizdiği gösterilmiştir. Yani IL-4 ve IL-13'ün SCCA1 ve SCCA2'nin lokal ekspresyonunu arttırdığı hem protein hem de transkripsiyonel düzeyde gösterilmiştir. Astımlı ve astımlı olmayan çocukların serum örneklerinde SCCA proteinin düzeyi ELIZA metodu kullanılarak ölçülmüştür. Astımlı bireylerde anlamlı olarak SCCA düzeyi yüksek bulunmuştur. Daha küçük bir hasta grubunda hastalığın alevlendiği zaman (atak durumunda) ve iyileşme dönemindeki (durgun durumda) SCCA düzeyleri karşılaştırıldığında, atak döneminde daha yüksek miktarda olduğu bulunmuştur (Yuyama et al., 2002).

Bronşial astımlı çocuklarda yapılan başka bir çalışmada (Nishi et al., 2005), sağlıklı ve hasta bireylerin serumlarında SCCA düzeyleri ölçülmüştür. Astımlı çocukların bir kısmında hastalığın alevlendiği dönem (astım atağı dönemi) içerisinde akut ve iyileşme fazlarında SCCA düzeyleri ölçülmüştür. SCCA

düzeylelerine ilave olarak serum örneklerinde IL-4, IL-13 ve interferon- γ (IFN- γ) düzeylelerine de bakılmış ve SCCA düzeyle ile olan ilişkisi değerdendirilmiştir.

Astımlı ve sağlıklı çocukların serumlarında ölçülen SCCA düzeyleleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Astımlı çocuklarda astım atağı süresince akut ve iyileşme dönemlerinde ölçülen SCCA düzeyleleri arasında ise anlamlı olarak bir fark vardır. İyileşme dönemin SCCA düzeyle akut döneme göre daha düşüktür . İlimlı astım atağından şiddetli astım atağına geçişteki SCCA protein miktarındaki artış; bu süreç içinde SCCA proteininin patofizyolojik bir rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır. İlimlı ve şiddetli astım atağında ölçülen IL-13 ve INF- γ düzeyleleri arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (Nishi et al., 2005).

Skuamoz Hücre Kanseri Antijeni (SCCA), ilk olarak rahim boyun kısmındaki Skuamoz Hücre Kanseri (SCC) dokulardan elde edilmiştir (Kato and Torigoe, 1977). Birçok çalışma SCC hastalarında, serumda SCCA miktarının arttığını göstermiştir (Duk et al., 1990; Bolli et al., 1994). Yüksek SCCA düzeyle hastalığın seviyesi ile ilişkili olarak bulunmuştur. SCC hastalarında tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında SCCA seviyesindeki değışiklikler gözlenerek, hastalığın seyri hakkında bilgi almak mümkündür (Duk et al., 1990).

SCCA1 ve SCCA2 ovalbumin-serpin (ova-serpin) proteinaz inhibitör ailesinden iki serpindir (Suminami et al., 1991). Bu proteinler aminoasit seviyesinde %92 benzerlik gösterir ve büyük bir olasılıkla gen duplikasyonu ile oluşmuşlardır (Schneider et al., 1995). Kromatografik olarak incelendiğinde SCCA'nın 14 alt parçasının olduğu, bunların asidik (pI 5,9-6,2) ve nötral (pI 6,3-6,6) olmak üzere iki ana grupta toplandığı gözlenmiştir (Kato et al., 1984). SCCA1 nötral, SCCA2 ise asidik izoformunu oluşturur. Nötral SCCA normal skuamoz hücrelerde ve skuamoz hücre karsinomlarında bulunurken asidik form sadece tümör adacıklarının periferinde ve skuamoz hücre karsinomlu hastaların serumlarında bulunmaktadır (Kato et al., 1984; Kato et al., 1987).

SCCA1 ve SCCA2 genlerinin her ikisinde 18. Kromozomun uzun kolunun 21.3 bölgesinde bulunmaktadır. Kromozom üzerinde SCCA1 geni telomere daha yakın konumda yer almaktadır. Her iki genin 8'er ekzonu vardır ve 1. ekzonları translasyona uğramaz. Her iki genin DNA dizilimleri ve cDNA dizileri sırayla Şekil 2.7, Şekil 2.8, Şekil 2.9 ve Şekil 2.10 üzerinde gösterilmiştir.

SCCA1 GENİ DNA DİZİLİMİ > chromosome:GRCh37:18:61321831:61697:-1

ATCCATAGAAACAGGAGGTAGATTACTGGTTTCCAGGGTCTCGAGTAAGGGAAGAACGAG
 ATACAAGTTTTCTTTTGGAGGTAGTGAAATTGTTGTGGAACGAGATCATGATGGTGATAG
 CACAACCTTTGTGAATATAATAAAAATCATTGAATTGTACAGTTGAATTTGTGGCATATAAA
 TTATATGTTAAAAAAGGGGGTCCACAAAACAAACAGCCCCCACTCTGGTTGTCAGGGAG
 ATATTGGATTAAATGGCCTTGGACAACAACCCCTCTCCCTGGCCACAGACATTCTTCAGAT
 TACAAGATATTCCAGAGGAAACACTGGAATGAGTCTGAAGCCAGGTGCTAAATGGAAGGA
 CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTTCTTTTTCTGCTTAATTTTTTA
 AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
 TGTCAGCCTGTTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG
 AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAAATTGGACTTAGAGTTCCACGTGATTGGGGAGGCCTC
 AGAATCACGGTAGGAGGCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAAATGAGGAA
 GAAGCAAAAGAAGAACCCTAATAAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAACATATCA
 TGAGAATAGCACAAAGAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
 AACACATGTGGAAATTCTGGTAGATACAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
 CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAAAGTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
 ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTACTGGTAGGATCACTGCCAAAAGCTGAGC
 ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
 CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
 TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
 TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
 TGGTGGGGTTTTTTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
 GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCTAAACTTATTCTCATTGGCATT
 GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTACTGCTGACTGCATTCTTATTTTT
 TCCCTATAGATTAAAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCTTTGTCATAAA
 TTTTCGTATTCTATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCACAGAGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCATTCCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT

PROMOTOR
ve 5' UTR

EKZON 1

AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
 TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTTACTTATTCTGCCAG
 AGCAAAATTAATAATACCTATTTTATCTGATTTGTCTTTATCTAAATGCTTAGTTCCAA
İNTRON BÖLGESİ

GGTCTATTACTTATTTACAGTAGTCTTTAAAAACACTAATTTTGTGAGGCTTCTAATTTAA
 GACATTAATATATTTAATATATGCACATTGTAGAAAGATTGAAACGTTAAAAATAAGATG
 AGGAAAACCTTTAATGTCAAATCTCACAACACAGATATATAATTTCTTTAAGAAAAATG
 TACTACAAAATACCATTCCATTTATTAAAGTCATTCTGACAGGAATCTGATGCTTTTCCA
GGAGTTCCAGATCACATCGAGTTCACTTGAATTCAGTCAAGCCAACACCAAGTTC
ATGTTTCGACCTGTTCCAACAGTTTCAAAAAATCAAAAGAGAACAAACATCTTCTATTCCCTT
ATCAGCATCACATCAGCATTAGGGATGGTCTCTTAGGAGCCAAAAGACAACACTGCACAA
CAGATTAAGAAGGTAGCTATCAGCATCATTATGTTGTCTGTTGCAGTTTTTCTCTGGTT
 CCGTCGGCTAGCACGCAGATGGTAATAGATGTGGTGGTCTGATGGGTAGCACAGGGGGCT
İNTRON BÖLGESİ

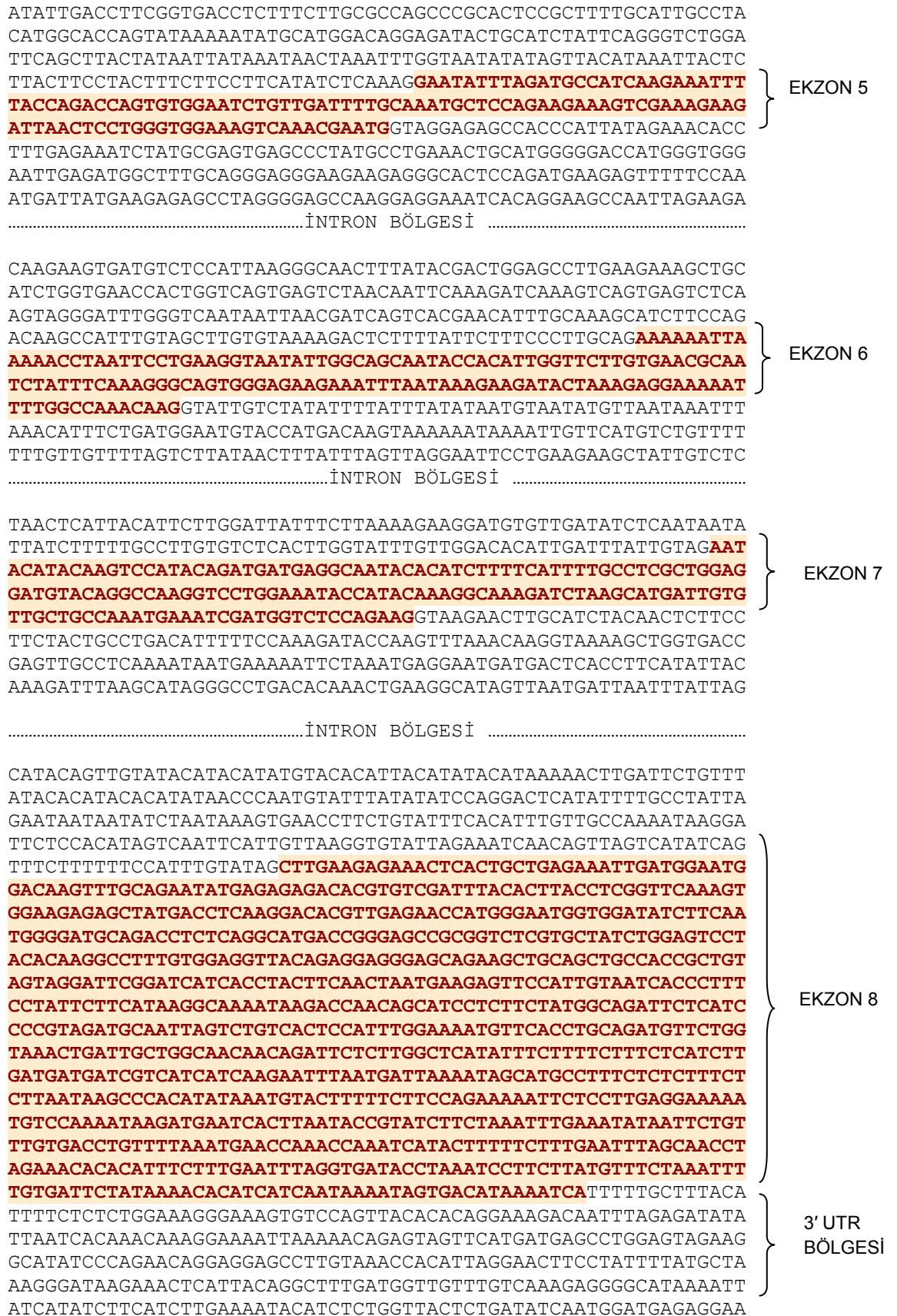
EKZON 2

GAGCAGGAATTCCTCGTAACTGTGAGACCACTGACTTAAACAGATCTTTTGTAGTAAAGTTT
 TCTTGTCCCCTTCATGTCTCTTCCAG**GTTCTTCACTTTGATCAAGTCACAGAGAACC**
ACAGGAAAAGCTGCAACATATCATGTGAGTCACAGAGCACTATGGTTCAGCTTTAGATCC
 CCGAACAGGTCATAGTTTGAACCTGGAACCTTCACAGAACTAAGAAAAGGCCATTTTTAG
 GGAAAATCTTGGACACAAAGATTGAGACATACAGAGTGGGTGGCATTTCATGGCACATA
İNTRON BÖLGESİ

EKZON 3

GGGTATTTGAGGTGAAATACACCAAGTATCAGGAATAAGCTCAAAGGTCTCTCATTGAGA
 CTACCAGCCATTAGGGACTGATCTAACAGACTTAGCATGGGTTAGTATTTACATTGATA
 CAGCAATTGAATGATCTCCTTTTTGATGTTTGAAG**GTTGATAGGTCAGGAAATGTTTCA**
CACCAGTTTTCAAAGCTTCTGACTGAATTCACAAAATCCACTGATGCATATGAGCTGAAG
ATCGCCAACAAGCTCTTCGGAGAAAAAACGTATCTATTTTTTACAGGTAATTTACCTGGC
 CTACCCACATTTTCAATTTGCATCCTGATGTCTGTGTCTCTGAGTGGCCAAATGGAAGAAAG
 CAAGGCAGATGAGCCTGACCGATCCAGGTGGAGAGCATTACTCAGAGTGCAATAGCTCC
 GTTTCCACAACCTCTCCCCCACTGGAGTGTCCAGACCCTAACAAATACATCACTGAAGTGT
İNTRON BÖLGESİ

EKZON 4



Şekil 2.7. SCCA1 geninin promotor, 5'UTR (5' translyasyona uğramayan bölge), ekzon, intron ve 3'UTR (3' translyasyona uğramayan bölge) bölgelerinin DNA dizilimi şekil üzerinde gösterilmiştir. Kırmızı ile betimlenmiş kısımlar ekzon bölgelerini göstermektedir. Translasyonun başlama kodonu mavi ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>).

AAATACTAACCACAGAGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAAATTCAGGATCTCACCTTCATTCCACAGACA
CACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCCTCTAGGAACACAGGAGTTCAGATCACATCGAGTTCACCATGAAT
.....-M--N-
TCACTCAGTGAAGCCAACACCAAGTTCATGTTTCGACCTGTTCCAAACAGTTCAGAAAATCAAAGAGAACCAACATC
-S--L--S--E--A--N--T--K--F--M--F--D--L--F--Q--Q--F--R--K--S--K--E--N--N--I--
TTCATATCCCCTATCAGCATCACATCAGCATTAGGGATGGTCCTCTTAGGAGCCAAAAGACAACACTGCAACAACAG
-F--Y--S--P--I--S--I--T--S--A--L--G--M--V--L--L--G--A--K--D--N--T--A--Q--Q--
ATTAAGAAGGTTCTTCACCTTTGATCAAGTCACAGAGAACCACAGGAAAAGCTGCAACATATCATGTTGATAGG
-I--K--K--V--L--H--F--D--Q--V--T--E--N--T--T--G--K--A--A--T--Y--H--V--D--R--
TCAGGAAATGTTTCATCACCAGTTTCAAAGCTTCTGACTGAATTC AACAAATCCACTGATGCATATGAGCTGAAG
-S--G--N--V--H--H--Q--F--Q--K--L--L--T--E--F--N--K--S--T--D--A--Y--E--L--K--
ATCGCCAACAAGCTCTTCGGAGAAAAACGTATCTATTTTTACAGGAATATTTAGATGCCATCAAGAAATTTTAC
-I--A--N--K--L--F--G--E--K--T--Y--L--F--L--Q--E--Y--L--D--A--I--K--K--F--Y--
CAGACCAGTGTGGAACTCTGTTGATTTTGCAAATGCTCCAGAAGAAAGTCGAAAGAAGATTAACCTCTGGGTGGAA
-Q--T--S--V--E--S--V--D--F--A--N--A--P--E--E--S--R--K--K--I--N--S--W--V--E--
AGTCAAACGAATGAAAAAATTA AAAACCTAATTCCTGAAGGTAATATTGGCAGCAATACCACATTGTTCTTGTG
-S--Q--T--N--E--K--I--K--N--L--I--P--E--G--N--I--G--S--N--T--T--L--V--L--V--
AACGCAATCTATTTCAAAGGGCAGTGGGAGAAGAAATTTAATAAAGAAGATACTAAAGAGGAAAAATTTTGGCCA
-N--A--I--Y--F--K--G--Q--W--E--K--K--F--N--K--E--D--T--K--E--E--K--F--W--P--
AACAGAATACATACAAGTCCATACAGATGATGAGGCAATACACATCTTTTCATTTTGCCTCGCTGGAGGATGTA
-N--K--N--T--Y--K--S--I--Q--M--M--R--Q--Y--T--S--F--H--F--A--S--L--E--D--V--
CAGGCCAAGGTCCTGGAAATACCATACAAAGGCAAGATCTAAGCATGATTGTGTTGCTGCCAAATGAAATCGAT
-Q--A--K--V--L--E--I--P--Y--K--G--K--D--L--S--M--I--V--L--L--P--N--E--I--D--
GGTCTCAGAAAGCTTGAAGAGAAACTCACTGCTGAGAAATTTGATGGAATGGACAAGTTTGCAGAATATGAGAGAG
-G--L--Q--K--L--E--E--K--L--T--A--E--K--L--M--E--W--T--S--L--Q--N--M--R--E--
ACACGTGTGCATTTACACTTACCTCGGTTCAAAGTGAAGAGAGCTATGACCTCAAGGACACGTTGAGAACCATG
-T--R--V--D--L--H--L--P--R--F--K--V--E--E--S--Y--D--L--K--D--T--L--R--T--M--
GGAATGGTGGATATCTTCAATGGGGATGCAGACCTCTCAGGCATGACCGGGAGCCGCGGTCTCGTGCTATCTGGA
-G--M--V--D--I--F--N--G--D--A--D--L--S--G--M--T--G--S--R--G--L--V--L--S--G--
GTCCTACACAAGGCCCTTTGTGGAGGTTACAGAGGAGGGAGCAGAAGCTGCAGCTGCCACCGCTGTAGTAGGATTC
-V--L--H--K--A--F--V--E--V--T--E--E--G--A--E--A--A--A--A--T--A--V--V--G--F--
GGATCATCACCTACTTCAACTAATGAAGAGTTCATTTGTAATCACCTTTCTCTATTTTCATAAGGCAAAATAAG
-G--S--S--P--T--S--T--N--E--E--F--H--C--N--H--P--F--L--F--F--I--R--Q--N--K--
ACCAACAGCATCCTCTTCTATGGCAGATTCTCATCCCGTAGATGCAATTAGTCTGTCACTCCATTTGGAAAATG
-T--N--S--I--L--F--Y--G--R--F--S--S--P--*.....
TTCACCTGCAGATGTTCTGGTAAACTGATTGCTGGCAACAACAGATTCTCTTGGCTCATATTTCTTTCTTTCTC
ATCTTGATGATGATCGTCATCATCAAGAATTTAATGATTAATAAGCATGCCTTTCTCTCTTTCTCTTAATAAGC
CCACATATAAATGTACTTTTTCTTCCAGAAAAATCTCCTTGAGGAAAAATGTCCAAAATAAGATGAATCACTTA
ATACCGTATCTTCTAAATTTGAAATATAATTCTGTTGTGACCTGTTTAAATGAACCAACCAATCATACTTT
TTCTTTGAATTTAGCAACCTAGAAACACACATTTCTTTGAATTTAGGTGATACCTAAATCCTTCTTATGTTTCTA
AATTTTGTGATTCTATAAAAACACATCATCAATAAAAATAGTGACATAAAAATCA

Şekil 2.8. SCCA1 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi.
(<http://www.ensembl.org>)

SCCA2 GENİ DNA DİZİLİMİ >chromosome:GRCh37:18:61303893:61313060:-1

CATAGAAACAGGAGGTAGATTCCCTGGTTTTCCAGGGTCTCCAGGAAGGGAAGAATGAAGTA
CAAGATTTCTTTTGGAGGTAGTGAAATTGTTGTGGAATGAGATCATGATGATGATAGCAC
AACTTTGTGAATATAATAAAATCATTGAATTGTACAGTTGAATTTATGGTATATAAAATTA
TATGTTAATAAAAAGGGGTCCACAAAACAAACAGCCCCCTCTGGTTGTCAGGGAGA
TATTGGATTAATGGCCTTGGACAACAACCCCTCTCCCTGGCCACAGACATTCTTCAGAT
TACAAGATATTCAGGGGAAACACTGGAATGAGTCTGAAGCCAGGTGCTAAACAGAAGGA
CCATTGAGAAATGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAATTTATTTTTCGGCTTCATTTTTA
AATGTAATAATAGAAAGCTGCCATTTAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
TGTCAGCCTGTTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTCATGCTGCTGATAAAAACATACTC
AGACTGGCAAGAAAAGAGGTTTAAATTGGGCTTAGAGTTCCACGTGATTGGGGAGCCCTC
AGAATCACAGTAGGAGGCAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAGATGAGGAA
GAAGCAAAAGAAGAAACCCCTGATAAACCCATCGGATCTCCTGAGGCTTATTAACATCA
TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
AATAACATGTGAAATTTCTGGTAGATACAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
ACTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTACATTCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCTAAACTTATTCTCATTGGCATT
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCAATTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTAATAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCTTTGTCATAAA
TTTTTATTCATATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTC
AAATACTAACCCAGAGGGAAAGGCAGCAAGAGGAGGAGGCATAAATTTAGGATCTCACCC
TTCATTCCACAGACACACACAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT

PROMOTOR
ve 5' UTR

EKZON 1

.....İNTRON BÖLGESİ

AAAGAGGGTCGATTACTTATTTACAATAGTCTTTAAAACCGTAGTTTTGTAAGCCTTCTA
ATTAGGACATTAATATATTTAATATATGCACATTGTAGAAAGATTGAAGCGTTAAAAATA
AGAGAAAACTTTAATGTCAAATCTCACAACCCAGATATATCATTTCTTTAAGAAAAT
TGTAATAAAAATACCATTCCATTTATTAAGTCAATTCTGACAGGAATCTGATGCTTTTC
CAG**GAGTTCCAGATCACATCGAGTTCACTGAAATCACTCAGTGAAGCCAACACCAAGT**
TCATGTTTCGATCTGTTCCAACAGTTCAAGAAATCAAAAGAGAACAAATCTTCTATTCCC
CTATCAGCATCACATCAGCATTAGGGATGGTCTCTTAGGAGCCAAAGACAACACTGCAC
AACAAATTAGCAAGGTAGCTATCAGCATCATTACGTTGTCTGTTGCAGTTTTTCTCTGG
TTCCGTCGGCTAGCACGCAGATGGTAATAGATGTGGTGGTCTGATGGGTAGCACAGGGGG

EKZON 2

.....İNTRON BÖLGESİ

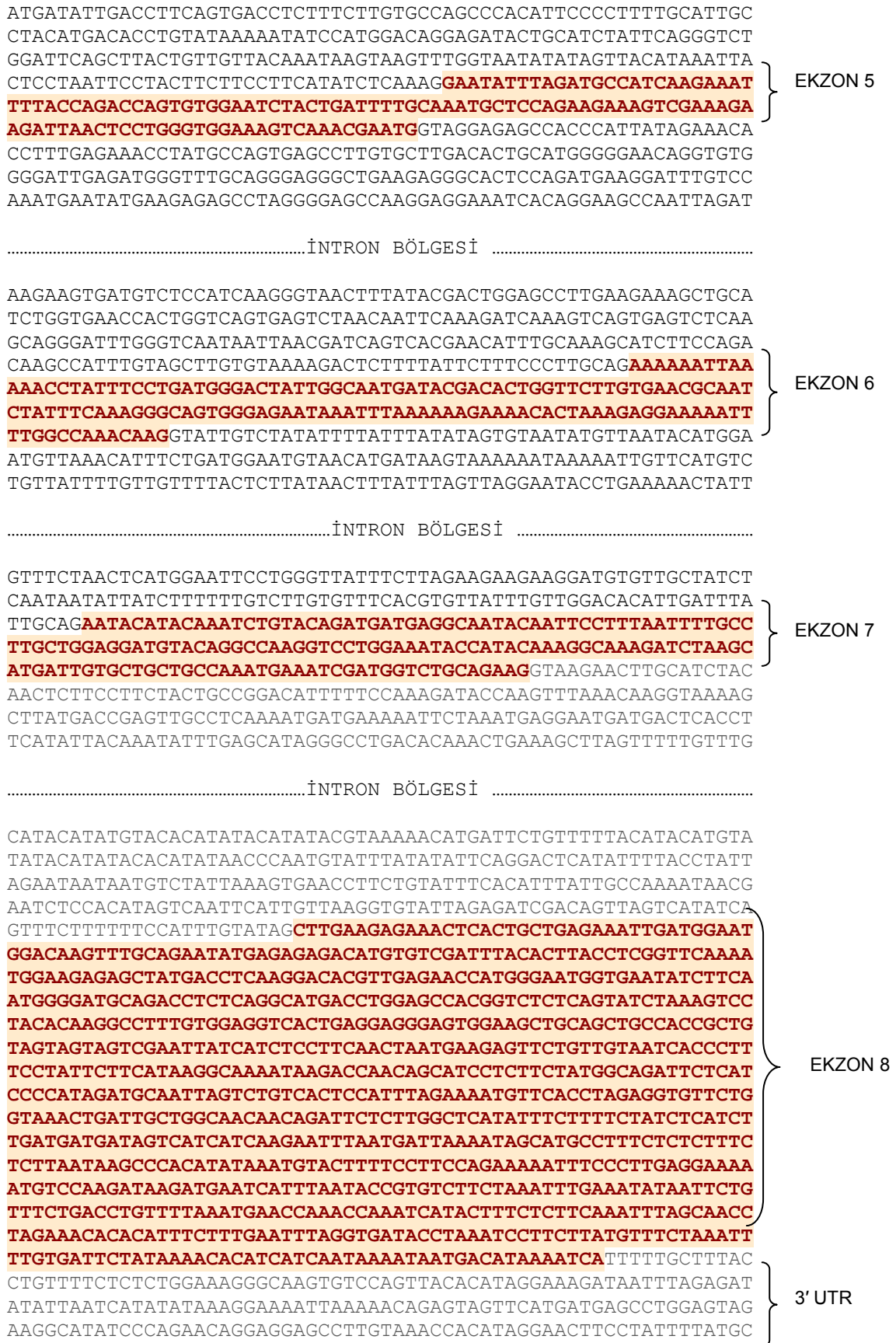
CTGTGCAGGAATCCATAACTGTGAGACCACTGACTTAAACAGATCTTTTGGAGTAAAGT
TTTCTTGTCCCCTTCATGTCTCTTCCAG**GTTCTTCACTTTGATCAAGTCACAGAGAACA**
CCACAGAAAAGCTGCAACATATCATGTGAGTCACAGAGCACTATGGTTCAGCTTTAGAT
CCCTGAACAGGTCATAGTTTAAACCTGGAACCTCACAAAACTAAGAAAAGGCCAGTTTT
AGGGAAAATCTTGACACAAAGATTGAGACATACAGAGTGGGTTGGCATTTCATGGCACA

EKZON 3

.....İNTRON BÖLGESİ

AAGGGTATTTGAGGTGAAATACACCAATTATCAGGGAATAACATCAAAGGTCTCAATGA
GACTACCAGCATTTAGGGACTGATCTAACAGACTTAGCATGGGTTTAGTATTTACATTGA
TACAGCAATTGAATGATCTCCCTTTTTGATGTTGAAG**GTTGATAGGTCAGGAAATGTTT**
ATCACCAGTTTTCAAAGCTTCTGACTGAATTCACAAATCCACTGATGCATATGAGCTGA
AGATCGCCCAACAGCTCTTCGGAGAAAAGACGTATCAATTTTTACAGGTAATTTACCTG
GCCTACCCACAATTTCAATTTGCATCCTGATGCTGTGCTCTGAGTGGCCAAATGGAAGAA
AGCAAGGCAGATGAGCCTGGCCGACTCAGGTGGAGAGCATTTACTCAGAGTGCATTAGCT
CCATTTCCACAACCTCTCCCCACTGGAGTGTCCAGACCCCAACGATACATCACTGAAGT

EKZON 4



Şekil 2.9. SCCA2 geninin promotor, 5'UTR (5' translasyona uğramayan bölge), ekzon, intron ve 3' UTR (3' translasyona uğramayan bölge) bölgelerinin DNA dizilimi şekil üzerinde gösterilmiştir. Kırmızı ile betimlenmiş kısımlar ekzon bölgelerini göstermektedir. Translasyonun başlama kodonu mavi ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>).

AAGAGGAGAGGCATAAAATTTAGGATCTCACCTTCATTCCACAGACACACACAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTT
CCTCTAGGAACACAGGAGTTCCAGATCACATCGAGTTCACCATGAATCACTCAGTGAAGCCAACACCAAGTTCA
.....-M--N--S--L--S--E--A--N--T--K--F--
TGTTGCATCTGTTTCCACAGTTCCAGAAAATCAAAGAGAACAACATCTTCTATTCCCTATCAGCATCACATCAG
M--F--D--L--F--Q--Q--F--R--K--S--K--E--N--N--I--F--Y--S--P--I--S--I--T--S--
CATTAGGGATGGTCTCTTAGGAGCCAAAGACAACACTGCACAACAAATTAGCAAGGTTCTTCACTTTGATCAAG
A--L--G--M--V--L--L--G--A--K--D--N--T--A--Q--Q--I--S--K--V--L--H--F--D--Q--
TCACAGAGAACCACAGAAAAAGCTGCAACATATCATGTTGATAGGTCAGGAAATGTTTATCACCAGTTTCAA
V--T--E--N--T--T--E--K--A--A--T--Y--H--V--D--R--S--G--N--V--H--H--Q--F--Q--
AGCTTCTGACTGAATTCACAAAATCCACTGATGCATATGAGCTGAAGATCGCCAACAAGCTCTTCGGAGAAAAGA
K--L--L--T--E--F--N--K--S--T--D--A--Y--E--L--K--I--A--N--K--L--F--G--E--K--
CGTATCAATTTTACAGGAATATTTAGATGCCATCAAGAAATTTTACCAGACCAGTGTGGAATCTACTGATTTTG
T--Y--Q--F--L--Q--E--Y--L--D--A--I--K--K--F--Y--Q--T--S--V--E--S--T--D--F--
CAAATGCTCCAGAAGAAAGTCGAAAGAAGATTAACCTCTGGGTGGAAGTCAAACGAATGAAAAAATTA AAAACC
A--N--A--P--E--E--S--R--K--K--I--N--S--W--V--E--S--Q--T--N--E--K--I--K--N--
TATTTCTGATGGGACTATTGGCAATGATACGACACTGGTCTTGTGAACGCAATCTATTTCAAAGGGCAGTGGG
L--F--P--D--G--T--I--G--N--D--T--T--L--V--L--V--N--A--I--Y--F--K--G--Q--W--
AGAATAAAATTTAAAAAGAAAACACTAAAGAGGAAAAATTTTGGCCAAACAAGAATACATACAAATCTGTACAGA
E--N--K--F--K--K--E--N--T--K--E--E--K--F--W--P--N--K--N--T--Y--K--S--V--Q--
TGATGAGGCAATACAATTCCTTTAATTTGCCTTGCTGAGGATGTACAGGCCAAGGTCCTGGAAATACCATACA
M--M--R--Q--Y--N--S--F--N--F--A--L--L--E--D--V--Q--A--K--V--L--E--I--P--Y--
AAGGCAAAGATCTAGCATGATTGTGCTGCTGCCAAATGAAATCGATGGTCTGCAGAAGCTTGAAGAGAACTCA
K--G--K--D--L--S--M--I--V--L--L--P--N--E--I--D--G--L--Q--K--L--E--E--K--L--
CTGCTGAGAAATTGATGGAATGGACAGTGTGAGAAATATGAGAGAGACATGTGTGATTTACACTTACCTCGGT
T--A--E--K--L--M--E--W--T--S--L--Q--N--M--R--E--T--C--V--D--L--H--L--P--R--
TCAAAATGGAAGAGAGCTATGACCTCAAGGACACGTTGAGAACCATGGGAATGGTGAATATCTTCAATGGGGATG
F--K--M--E--E--S--Y--D--L--K--D--T--L--R--T--M--G--M--V--N--I--F--N--G--D--
CAGACCTCTCAGGCATGACCTGGAGCCACGGTCTCTCAGTATCTAAAGTCTTACACAAGGCCTTTGTGGAGTCA
A--D--L--S--G--M--T--W--S--H--G--L--S--V--S--K--V--L--H--K--A--F--V--E--V--
CTGAGGAGGGAGTGAAGCTGCAGCTGCCACCGCTGTAGTAGTAGTGAATTATCATCTCCTTCAACTAATGAAG
T--E--E--G--V--E--A--A--A--A--T--A--V--V--V--V--E--L--S--S--P--S--T--N--E--
AGTTCGTGTGTAATCACCTTTTCTATCTTTCATAAGGCAAATAAGACCAACAGCATCCTCTTCTATGGCAGAT
E--F--C--C--N--H--P--F--L--F--F--I--R--Q--N--K--T--N--S--I--L--F--Y--G--R--
TCTCATCCCCATAGATGCAATTAGTCTGTCACCTCCATTTAGAAAATGTTACCTAGAGGTGTTCTGGTAAACTGA
F--S--S--P--*--.....
TTGCTGGCAACAACAGATTCTCTGGCTCATATTTCTTTCTATCTCATCTTGATGATGATAGTCATCATCAAGA
ATTTAATGATTAAAAATAGCATGCCTTTCTCTTTCTCTTAATAAGCCCACATATAAAATGTACTTTTCTTCCAG
AAAAATTTCCCTTGAGGAAAAATGTCCAAGATAAGATGAATCATTTAATACCGTGTCTTCTAAATTTGAAATATA
ATTCTGTTTCTGACCTGTTTTAAATGAACCAACCAATCATACTTTCTTCTTCAAATTTAGCAACCTAGAAAAC
ACATTTCTTTGAATTTAGGTGATACCTAAATCCTTCTTATGTTTCTAAATTTTGTGATCTATAAAACACATCAT
CAATAAAATAATGACATAAAATCA

Şekil 2.10. SCCA2 geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi (<http://www.ensembl.org>)

SCCA yalnızca jinekolojik SCC'ler için değil akciğer, baş-boyun ve özafagus SCC'leri içinde iyi bir tümör belirteçidir.

Çataltepe ve arkadaşları SCCA1 ve SCCA2 proteinlerinin tümör hücreleri dışında normal hücrelerde de ifade olduklarını göstermişlerdir. SCCA proteinleri, deride, timus, trake, bronş, dil, tonsil, özefagus, anüs, rahim ağzı ve vajinada ifade edilmektedir (Çataltepe et al., 2000).

SCCA miktarı yalnızca kanserli hücrelerde değil aynı zamanda atopik dermatit, psöriasis gibi deri hastalıkları ve bronşit, pnömoni gibi akciğer hastalıklarında da artmaktadır (Campbell and De'Ambrosio, 1990; Molina et al., 1990).

Kawashima ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada astımlı olmayan atopik dermatitli (AD) çocukların serumlarında SCCA düzeylerinin yüksek olduğu, bu düzeylerin hastalığın ağırlığının derecesi ile ilişki gösterdiği, fakat serum eozinofil ve IgE düzeyleri ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (Kawashima et al., 2000).

SCCA1 ve SCCA2 proteinlerinin AD ile ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada; AD'li hastaların lezyonlu ve lezyonsuz bölgelerinden alınan deri örneklerinde normal bireylerin derilerinden alınan örneklerden elde edilen cDNA kullanılarak, ifade olan genler mikroaray tekniği ile araştırılmış ve SERPINB3'in (SCCA1) 10 kat, SERPINB4'ün (SCCA2) ifadesinin normale göre 68 kat arttığı bulunmuştur. Genlerin ifadeleri gerçek zamanlı (kantitatif) RT-PZR tekniği kullanılarak tekrar kontrol edilmiş ve AD'li hastaların lezyon bulunan bölgelerinde SCCA1 ve SCCA2 genlerinin uyarıldığı bulunmuştur (Mitsuishi et al., 2005).

Mitsuishi ve arkadaşları çalışmalarında, immünohistokimya yöntemi kullanılarak SCCA proteinlerinin ifadesinin epidermisdeki keratinositlerde arttığını göstermişlerdir. Keratinosit hücrelerinde IL-4 ve IL-13'ün SCCA ifadesi üzerine etkilerini görmek için keratinosit kültürleri bu sitokinlerle uyarılmış ve SCCA miktarının kuvvetli biçimde arttığı transkripsiyonal düzeyde gösterilmiştir. TNF ve INF- γ ile uyarılan keratinositlerde ise SCCA1 ve SCCA2 ifadesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. SCCA serum düzeyi eozinofil sayısı, laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi ve IgE seviyesi ile ilişkili bulunmuştur ve bunlara ilave olarak AD'nin klinik şiddeti ile orantılı olarak serum SCCA düzeyi yüksek çıkmıştır. Tüm sonuçlar bir

arada değerlendirildiğinde SCCA'nın, AD için iyi bir biyomarker olabileceği bildirilmiştir (Mitsuishi et al., 2005).

Yuyama ve arkadaşlarının çalışmasındaki astımlı hastaların atopik dermatitleri olmadığı için serum SCCA düzeyindeki yüksekliğin atopik dermatit ile ilişkili olmayıp astıma bağlı olabileceği yorumu yapılmıştır. Ayrıca SCCA yüksekliğinin atopiye mi yoksa astıma mı bağlı olduğu tartışmasına açıklık kazandırmak için atopik sağlıklı ve atopik astımlı hastaların bronş biyopsileri çalışılmış ve SCCA ifadesi sadece atopik astımlılarda yüksek bulunmuştur. Böylelikle tek başına atopinin SCCA ifadesinde artışa neden olamadığı, astım hastalığının bu konuda belirleyici olduğu öne sürülmüştür.

Yaygın diğer bir deri hastalığı olan ve keratinositlerin aşırı miktarda çoğaldığı sedef hastlığında; hastaların deri lezyonlarında ve serumlarında SCCA miktarının arttığı gösterilmiştir (Takeda et al., 2002). AD'den farklı olarak sedef hastlığında Th1 tip sitokinler baskın olarak ifade olmaktadır. İyileşme döneminde Th2 tip sitokinlerin psöriatik deriye sızdığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Gudjonsson et al., 2004) ve IL-4 veya IL-13 ya da bazı bilinmeyen uyarılar yoluyla sedef hastalarında SCCA ifadesinin tetiklenilebileceği varsayılmıştır (Mitsuishi et al., 2005).

Sedef hastalarının deri lezyonları üzerine yapılan çalışmalar, lizozomal asit proteaz ve Katepsin L varlığını ortaya koymuş ve buna ilave olarak degranülasyonla Triptaz, Kimaz ve Katepsin G gibi çeşitli proteazları salan mast hücrelerinin bu lezyonlarda sayısının arttığını göstermiştir. Deri lezyonlarındaki artan proteaz miktarına karşı hücrelerin koruyucu olarak SCCA proteinlerini sentezledikleri düşünülmektedir (Takeda et al., 2002).

Uemura ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada SCCA1 ve SCCA2'nin hücre içinde sadece sitoplazmada bulunduğu, hücrelerden aktif olarak sekrete edilmediği saptanmış, serumda bulunmasının dolaşıma pasif olarak geçmesine bağlı olabileceği yorumu yapılmıştır (Uemura et al., 2000).

SCCA1 ve SCCA2 plazminojen aktivator inhibitör tip 2, elastaz inhibitor ve plasental trombin inhibitor gibi serpinlerle homoloji gösterir. SCCA1 katepsin K, L,

S gibi sistin proteinazları inhibe ederken SCCA2 katepsin G, mast hücre kimazı gibi serin proteinazları inhibe etmektedir (Çataltepe et al., 2000).

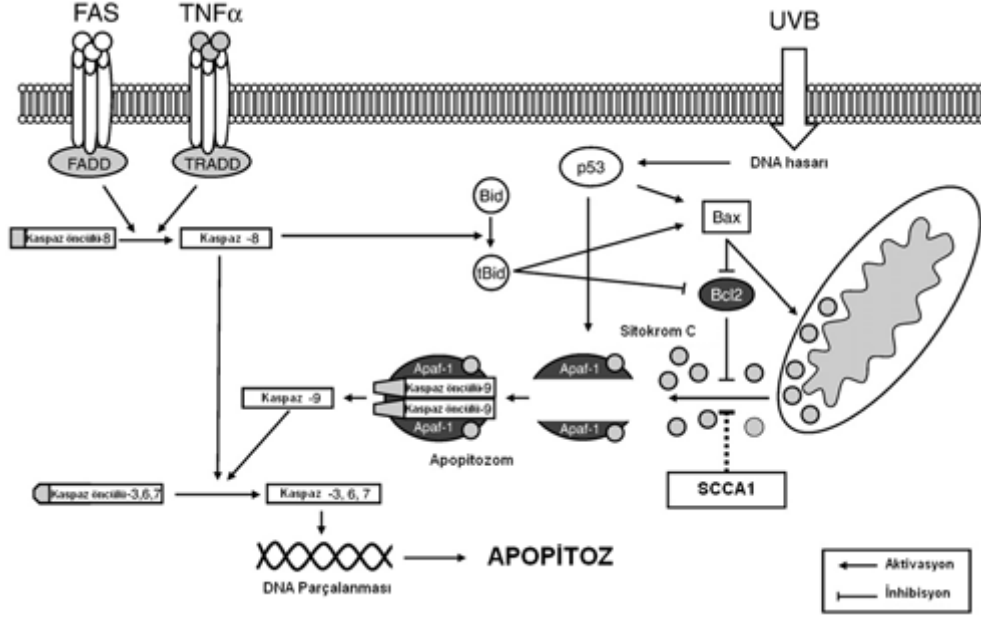
SCCA proteinlerinin proteazları inhibe etmesinin yanı sıra farklı metabolik yollardaki etkileri de gösterilmiştir. İn-vitro olarak SCCA1'in aktive NK hücreleri, TNF- α ve antikanser ilaçlar ile uyarılan apoptozu; SCCA2'nin ise, radyasyon ve antikanser ilaçlarla ortaya çıkan apoptozu engellediği gösterilmiştir (Suminami et al., 2000). Buna ilave olarak, Skuamoz Hücre Kanseri hücrelerinin, antisens SCCA mRNA ifade eden retrovirüsler ile enfekte edilmesinin SCCA ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (Suminami et al., 2001). Bu baskılanmanın apoptotik tümör hücrelerindeki artışla ve morfolojik olarak NK hücreleri olabileceği görünümü veren tek çekirdekli hücre infiltrasyonu (sızmasıyla) ile birlikte gittiği gözlenmiştir.

Apoptoz, çok hücreli canlılarda embriyo gelişimi, doku yapılanması, immün sistem gelişimi ve enfeksiyona ve tümör gelişimine karşı hücre sel cevap gibi birçok hücre sel olayı düzenleyen ve kontrollü hücre ölümü olarak da adlandırılan hücre sel olaydır (Abbas et al., 2007c; Vidalino et al., 2009). TNF- α , Fas, Mitojen-Aktive Protein Kinaz (MAPK) ve Stres-Aktive Protein Kinaz (SAPK) gibi birçok hücre içi ve hücre dışı faktörler apoptozu tetikleyebilir. Serpinlerin apoptozu karşı koruyucu rol üstlendiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Serpin ailesinin üyesi olan SCCA proteinlerinin apoptozun inhibisyonunda farklı hücre sel yollar kullandığı varsayılmaktadır (Vidalino et al., 2009).

Kaspaz 3 ve Kaspaz 9, apoptoz kaskatının başlamasında ve sinyalizasyonunda önemli görevleri olan proteazlardır. Kaspaz 3, kromatin kondensasyonu içeren apoptozla ilişkili çekirdek (nükleus) değişikliklerinin çoğundan sorumludur. Kaspaz 9 ise Kaspaz 3'ün aktivasyonunun önemli bir kısmından sorumludur. Radyasyonla apoptozun uyarıldığı 293T hücrelerinde, SCCA varlığında Kaspaz 9 ve Kaspaz 3'ün aktivitelerinin baskılandığı gösterilmiştir (Murakami et al., 2001).

TNF- α ilişkili hücre ölümünde; TNF- α ve reseptörünün Kaspaz 2, Kaspaz 8 ve/veya MAPK aktivasyonu ile apoptoz sinyalizasyon kaskadını başlattığı gösterilmiştir. Katepsin G (serin proteaz) ve katepsin B'nin de (sistein proteaz) TNF- α tarafından indüklenen apoptotik yolda yer almaktadır. Bunlara ilave olarak Kaspaz 9 aktivasyonundan sorumlu olan mitokondrilerdeki sitokrom c'nin salınımı Katepsin D ve Katepsin B tarafından indüklenmektedir. SCCA1'in

sitokrom c vasıtasıyla TNF- α tarafından indüklenen hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (Hashimoto K et al., 2005) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Apoptotik yollar üzerine SCCA1'in olası etkilerini gösteren varsayımsal model (Vidalino et al., 2009'dan alınmıştır).

Yakın zamanda SCCA1 proteininin keratinosit hücrelerinde UV ile uyarılmış apoptozu, c-JUN NH₂ – Terminal Kinazı (JNK1) baskılayarak engellediği gösterilmiştir. İn situ hibridizasyon sonuçları, SCCA1 mRNA'sının normal epidermiste düşük miktarda bulunmasına karşın, UV ışınının epidermisin üst tabakasında kuvvetli SCCA1 mRNA uyarımına yol açtığını göstermiştir.

UV ile uyarılma sonrasında, sitoplazmik konumda yer alan SCCA1 proteininin nükleusa taşındığı gözlenmiştir. Bu taşınma işinde görev alan moleküller araştırıldığında yalnızca aktif formdaki JNK1'in SCCA1 proteinine bağlandığını ve bu yolla hücre içine transferinin gerçekleştiği gösterilmiştir. JNK1 proteinin farklı hücre tiplerinde UV ile uyarılan apoptozdan sorumlu olduğu daha önceki

çalışmalarda gösterilmiştir. SCCA1 proteinin JNK1 üzerindeki etkisi araştırıldığında; proteinin kinaz aktivitesi üzerine dzenleyici bir rol oynadığını ve bu yolla apoptoz üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Katagiri et al., 2006).

SCCA'nin özellikle atopik astımdaki patogenetik rolü üzerine ışık tutacak bir çalışma yakın tarihte yayınlanmıştır (Sakata et al., 2004). Bu çalışmada Sakata ve arkadaşları Dermatofagoides pteronyssinusün majör antijeni olan Der p 1'in katalitik aktivitesinin bronşial astımda önemli olmasından yola çıkararak IL-4 ve IL-13 tarafından indüklenen SCCA proteinlerinin hedeflerinden birinin Der-p 1 olabileceği hipotezini öne sürüp test etmişlerdir. Der-p 1 epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları kopararak bronş epitel bütünlüğünü bozar (Wan et al., 1999); inflamatuvar sitokinlerin ve RANTES'in ekspresyonunu artırır (Asokanathan et al., 2002; Stacey et al., 1997; King et al., 1998) ve T hücreleri üzerindeki CD25 ve dentritik hücreler üzerindeki CD40 moleküllerini hücre yüzeyinden ayırarak Th2 hücrelerinde indüsiyona yol açar (Schulz et al., 1998).

SCCA proteinlerinin hücrede üstlendikleri görevleri yalnızca proteaz inhibisyon mekanizması ile açıklamak oldukça güçtür. Farklı metabolik yollarda muhtemelen proteaz görevlerinin dışında farklı görevler de üstlenmektedirler. SCCA proteinlerinin astımla ilişkili olabileceğine dair çalışmalar olmakla birlikte bunlar son derece sınırlıdır ve mekanizmayı açıklamak için yetersizdir. Bu tez çalışmasında, SCCA proteinlerinin astım patolojisindeki yerini belirlemek amacıyla öncelikli olarak astımla ilişkili olabilecek genetik varyasyonlar DNA dizi analiz yöntemi kullanılarak araştırılmış ve astımda rol oynayan inflamatuvar hücrelerden eozinofillerde SCCA1 ifadesine bakılmıştır. Diğer yandan patolojide önemli bir yeri olan hücre ölümü ve mukus salınımının metabolik yolları üzerinde SCCA proteinlerinin etkisi araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatrik Astım ve Allerji Ünitesine başvuran hastalardan ve sağlıklı bireylerden Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı ve çalışma grubu tarafından alınmıştır. Hastalara astım tanısı GINA (The Global Initiative for Asthma: Astım için Küresel Girişim) tarafından hazırlanan yönergeler doğrultusunda, uzman allerji doktoru tarafından konulmuştur (GINA, 2002). Astım hastalarının ve sağlıklı bireylerin akciğer kapasite ölçümleri, total IgE değerleri ve 30 hava alerjisi ile 8 besin alerjisini içeren deri testleri Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı öncülüğünde Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Astım ve Allerji Ünitesi Laboratuvarlarında yapılmıştır. Deri testi sonucu negatif kontrolden > 3 mm daha büyük çıkan sonuçlar pozitif olarak değerlendirmeye alınmıştır ve testlerden en az birinin pozitif çıktığı bireyler atopik olarak sınıflandırılmıştır. Hastalara ait klinik verilerin elde edilmesi, değerlendirilmesi ve genotip sonuçlarının hastalara ait klinik tablolarla ilişkilendirilme analizleri Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı ve ekibi tarafından yapılmıştır. Çalışma için gerekli etik kurul izni ve çalışmaya dahil olan kişilerden birey onam belgesi alınmıştır.

3.2. Kandan DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Yen ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan DNA izolasyonu yöntemi bazı değişiklikler uygulanarak kullanıldı (Yen et al., 1992). Bireylerden EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 3-4 ml'lik kan örneklerine aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

1. EDTA'lı tüplere alınan 3-4 ml'lik kandan 400 µl, 1,5 ml'lik ependorf tüpü içine aktarıldı.
2. Ependorf tüp içindeki 400 µl kan örneğine Tris-EDTA (TE) tamponu ilave edilerek hacim 1,5 ml'ye tamamlandı.

TE Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7,6

3. Tüpler 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant kısmı alttaki pelete dokunulmadan atıldı.
5. Yıkama işlemi 2., 3. ve 4. basamakların üç kez tekrarlanması ile tamamlandı.
6. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine lizis tamponu ilave edildi ve son hacim 500 µl' ye TE tamponu ilave edilerek tamamlandı.

Lizis Tamponu:

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	80 µl
1 M NaCl	90 µl
10 mg/ml Proteinaz K	10 µl

7. Tüpler 56 °C' de 1,5-2 saat süreyle peletin durumuna göre inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonunda tüplerin üzerine 250'şer µl fenol-kloroform (1:1 oranında) ilave edildi.
9. Tüpler 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
10. DNA içeren üst faz alınarak temiz bir ependorf tüpe aktarıldı.
11. Üzerine DNA'nın çökmesi için soğuk %100'lük etil alkol ilave edildi.
12. %100'lük etil alkol uzaklaştırıldı.
13. Tüplere soğuk %70'lik etil alkol ilave edildi.
13. Tüplerdeki %70'lik etil alkol DNA'ya dokunulmadan uzaklaştırıldı.
14. Elde edilen DNA, miktarına göre, 400-800 µl arasında steril distile suda çözüldü.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu çalışmada sağlıklı bireyler ve astım hastalarından alınan kanlardan genomik DNA izole edilmiş ve bu genomik DNA'lardan SCCA1 ve SCCA2 genlerine ait

promotor, 8 ekzon (ekzon-intron bağlantı bölgeleri dahil) ve genlerin 3' UTR bölgelerinin amplifikasyonları, bazı değişikliklerle birlikte Saiki ve arkadaşlarının geliştirdiği yonteme göre yapılmıştır (Saiki et al., 1988) .

PZR Reaksiyon Karışımı

DNA	3 µl
10 x Reaksiyon Tamponu	5 µl
2,5mm dNTP Karışımı	1 µl
İleri primer	1 µl (10 pmol)
Ters primer	1 µl (10 pmol)
H ₂ O	38,5 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl (2,5 ünite)

10x Reaksiyon Tamponu: 10 mM Tris HCl pH=9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, %0,1 Triton X 100, 0,2 mg/ml BSA veya Jelatin.

Hazırlanan örnekler DNA çift zincirinin açılması, olası proteaz kontaminasyonunun önlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 94 °C'de 4 dakika denatüre edildi. Polimerizasyon işlemi DNA ısı döngüleyicide, aşağıdaki PZR programı uygulanarak gerçekleştirildi.

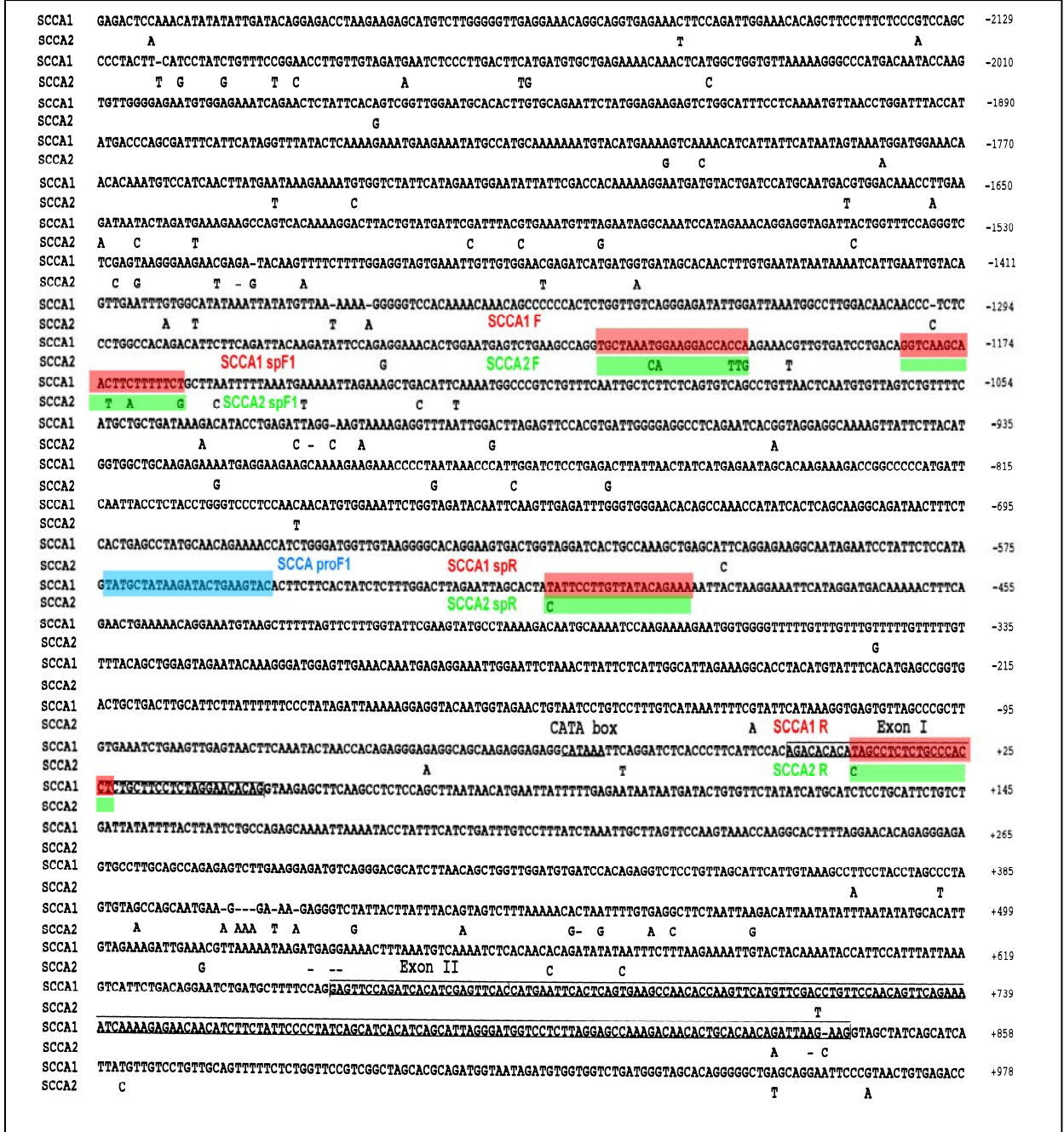
94 °C	45''	}	32 döngü
58 °C	45''		
72 °C	1' 30''		

En son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72 °C'de 7 dakika polimerizasyon sağlandı.

Amplifikasyon sonunda örnekler %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

3.3.1 SCCA1 ve SCCA2 Genlerinin Promotor ve 5' UTR (5' Translasyona Uğramayan Bölge) Bölgelerinin Amplifikasyonu

20 astım ve 20 sağlıklı bireyde, SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor, ve 5' UTR bölgeleri SCCA1F-SCCA1R ve SCCA2F-SCCA2R primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 3.1). SCCA1 ve SCCA2 genlerinin göstermiş oldukları yüksek homoloji nedeniyle amplifikasyon için kullanılan primerler özellikle iki genin birbirinden en fazla fark gösterdiği bölgeler seçilerek yapıldı.



Şekil 3.1. SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor ve 5' UTR bölgelerinin amplifikasyonu ve DNA dizi analizi için tasarlanan primerleri şekil üzerinde gösterilmiştir. Kırmızı ile betimlenmiş olan primerler SCCA1 özgün, yeşil ile betimlenmiş olan primerler SCCA2 özgün, mavi ile betimlenmiş primer her iki gen için ortak primerdir (SCCA1 ve SCCA2 DNA dizilimi Hamada et al., 2001'den alınmıştır).

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Ürünlerinin Saflaştırılması

DNA dizi analizine girecek ürünlerin temizlenmesi, reaksiyon sonunda oluşacak fondaki özgül olmayan bant kirliliğinin önlenmesinde çok önemlidir. Bu nedenle reaksiyon öncesi tüm ürünlerin saflaştırılması gerekmektedir. Kullanılan tamponlar ve yöntem "Invisorb Spin PCRapid Kit" üretici firmasının (Invitex, Berlin, Germany) tavsiye ettiği şekilde uygulandı.

1. PZR ürünü üzerine 130 µl tampon (PZR ürünü kolona bağlamak için) eklenerek içerisinde kolon bulunan ependorf tüpüne aktarıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
3. Kolon temiz tüpe aktarıldı. Üzerine 700 µl yıkama tamponu eklendi.
4. 10.000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Kolon temiz ependorf tüplere aktarıldı. 3 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 30 µl PZR örneklerini kolondan söken tampon eklendi. Oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edildi.
7. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve altta toplanan sıvı kısım DNA dizi analizinde kullanıldı.

3.5. Otomatik DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)

Dizi analiz reaksiyonu "ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit" kullanılarak ve üretici firmanın (Applied Biosystems, CA/USA) önerileri doğrultusunda bazı değişiklikler yapılarak aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Reaksiyon karışımı:

PZR ürünü	3 µl
Big Dye Reaksiyon Karışımı	8 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O	8,5 µl
Toplam Hacim	20 µl

2. Reaksiyon tüpleri karıştırıldı ve ısı döngüleyiciye yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

96 °C	10''	} 25 döngü
50 °C	5''	
60 °C	4'	

3. Döngüler tamamlandıktan sonra her bir tüpe 2 µl 3M sodyum asetat ilave edildi.
4. Tüplere 50 µl soğuk % 95- 100'lük etil alkol ilave edildi.
5. Karışım 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
6. 15 dakika -20 °C'de bekletildi.
7. 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
8. 250 µl soğuk %70'lik etil alkol ilave edildi.
9. 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet oda ısısında kurumaya bırakıldı.
11. Pelet 20 µl formamid ilave edilerek çözüldü ve vortekslendi.
12. Örnek, kapiller elektroforez sisteminin tüplerine aktarıldı ve 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi.
13. 5 dakika -20 °C'de bekletildi.
14. Kapiller elektroforez sisteminde yürütüldü.

3.6. SCCA1 Genotipleme Metodu

SCCA1 geninin promotor bölgesinde bulunan A/G tek nükleotit değişikliğinin (GAG[A/G]CTT motifi) astımlı ve sağlıklı bireylerde sıklığını belirlemek için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Birbirine bağlı kalıtılan dört polimorfizmden bir tanesinin

genotip sonucu diğer üç polimorfizmin de sonucunu vereceğinden tek bir polimorfizmin genotiplenmesi promotör bölgedeki dört polimorfizmin sonucu için yeterlidir.

Astımlı ve sağlıklı bireylere ait DNA örnekleri, SCCA1 genine özgü SCCA1spksF1 SCCA1spksR primerleri kullanılarak çoğaltıldı ve ***A/w 26/*** $\left[\begin{array}{l} 5' \dots ^5(N)GAGAC \dots 3 \\ 3' \dots ^1(N)CTCTG \dots 5' \end{array} \right]$ restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi (Şekil 3.2).

SCCA1 Geni Promotör Bölgesi > Chromosome:GRCh37:18:61321931:61330697:-1

```

61330337 CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTCTTTTTCTGCTTAATTTTTTA 61330278
61330277 AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG 61330218
61330217 TGTCAGCCTGTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG 61330158
61330157 AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTAATTGGACTTAGAGTTCACGTGATTGGGGAGGCCTC 61330098
SCCA1 spksF1
61330097 AGAATCACGGTAGGAGGCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAAATGAGGAA 61330038
61330037 GAAGCAAAAGAAGAAACCCCTAATAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAACTATCA 61329978
A/w 26/ Restriksiyon Endonükleaz Tanıma Bölgesi
61329977 TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC 61329918
61329917 AACAAATGTGAAATTTCTGGTAGATAACAATTCAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC 61329858
61329857 CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC 61329798
61329797 ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC 61329738
61329737 ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA 61329678
61329677 CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTTCCTTGTATACAGAAAAT 61329618
SCCA1 spksR
61329617 TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTCAGAAGTAAAAACAGGAAAATGTAAGC 61329558
61329557 TTTTGTAGTTCTTTGGTATTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA 61329498
61329497 TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG 61329438
61329437 GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTTGGAATTCTAAACTTATTCTCATTGGCATT 61329378
61329377 GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT 61329318
61329317 TCCCTATAGATTAAGGAGGTACAATGGTAGAAGTGAATCTGTCCTTTGTCATAAA 61329258
61329257 TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC 61329198
61329197 AAATACTAACCACAGAGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC 61329138
61329137 TTCACTTCCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCCCTCTAGGAACACAGGT 61329078

```

} Ekzon1

Şekil 3.2. SCCA1 geninin promotör bölgesinin genotiplemesinde kullanılan ileri ve ters primerler yeşil ile betimlenmiştir. *A/w26/* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi sarı ile betimlenmiştir. SCCA1 geninin ekzon 1 bölgesi kırmızı ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>).

3.6.1. SCCA1 Genotipleme için PZR Koşulları

Astımlı ve sağlıklı bireylerin SCCA1 geninin promotör bölgesinin genotiplemesi için kullanılan PZR koşulları aşağıda verildiği gibidir.

94°C	30''	} 30 döngü
50°C	30''	
72°C	45''	

En son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72 °C'de 7 dakika polimerizasyon sağlandı.

3.6.2. *A/w26/* Restriksiyon Enzimi Kesim Koşulları

Amplifikasyon ürünleri aşağıda verilen koşullarda *A/w26/* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir.

Amplifikasyon ürünü	10 µl
10XTampon	2,5 µl
<i>A/w26/</i> (<i>BsmAI</i>) Restriksiyon Enzimi	0,5 µl
H ₂ O	12 µl
Toplam Hacim	25 µl

Reaksiyon karışımı 37°C'ye ayarlı etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 6X durdurma tamponundan (% 40 sükröz, % 0,25 brom fenol mavisi, % 60

10XTBE tamponu) her reaksiyon tüpüne 2 µl eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve *A/w26/* kesimi sonucunda elde edilen ürünler % 2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezleri gerçekleştirildi.

3.7. SCCA2 Genotipleme Metodu

SCCA2 geninde yer alan G/T tek nükleotit değişikliğinin (TTG[G/T]TTT motifi) astımlı ve sağlıklı bireylerde sıklığını belirlemek için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı.

Bu polimorfizmi tanıyan bir enzim doğal olarak bulunmadığı için *Bsal* $\left[\begin{array}{l} 5'..^5(N)GAGACC..3' \\ 3'..^1(N)CTCTGG..5 \end{array} \right]$

enzimi ile kesimi sağlayacak SCCA2 BSA1R primeri tasarlandı. Birinci basamakta SCCA2-F ve SCCA2-R primerleri kullanılarak SCCA2 genine özgül amplifikasyon yapıldı . İkinci basamakta; genotiplendirme için bu PZR ürünlerinden SCCA proF1-SCCA2 BSA1R primerleri kullanılarak amplifikasyon yapıldı (Şekil 3.3). SCCA2 BSA1R primerinin 3' ucunda yer alan son dört nükleotitten (3'**AGAG**.....5') GAG nükleotitleri (bu nükleotitler kalıp DNA ile eşleşmezler), restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesini oluşturmak için primere konulmuştur. Son nükleotit (3' uçta A) primerin SCCA2 dizisine özgün olarak bağlanmasını sağlamaktadır ve böylelikle amplifikasyon gerçekleşebilmektedir .

SCCA2 Geni Promotor Bölgesi >chromosome: GRCh37:18:61303993:61313060:-1

```

61312820 TATTGGATTAAATGGCCTTGGACAACAACCCCTCTCCCTGGCCACAGACATTTCTCAGAT 61312761
61312760 TACAAGATATTCCAGGGGAAACACTGGAATGAGTCTGAAGCCAGGTCCTAAACAGAAGGA 61312701
61312700 CCATTGGAGAAATGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAATTTATTTTCGGCTTCATTTTAA 61312641
SCCA2-F
61312640 AATGTAATAATTAGAAAGCTGCCATTTAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG 61312581
61312580 TGTCAGCCTGTTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAAACATACCTG 61312521
61312520 AGACTGGCAAGAAAAAGAGGTTAATTTGGGCTTAGAGTTCACGTGATTGGGGAGGCCTC 61312461
61312460 AGAATCACAGTAGGAGGCAAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAGATGAGGAA 61312401
61312400 GAAGCAAAAAGAAAGAAACCCCTGATAAACCCATCGGATCTCCTGAGGCTTATTAACATCA 61312341
61312340 TGAGAATAGCACAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC 61312281
61312280 AATAACATGTGAAATTTCTGGTAGATACAATCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC 61312221
61312220 CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC 61312161
61312160 ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC 61312101
61312100 ACTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA 61312041
SCCA proF1
61312040 CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTACATTCCTTGTTATACAGAAAAAT 61311981
61311980 TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTCAGAAGTAAAAACAGGAAATGTAAGC 61311921
61311920 TTTTGTAGTTCTTTGGTATTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAATCCAAGAAAAGAA 61311861
61311860 TGGTGGGGTTTTTGTGTTTGGTTGGTTTTGTTTTGTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAAG 61311801
SCCA2BSA1R 3'AGAGCAAAAACAAATGTCGAC5'
61311800 GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTTGGAATTCTAAACTTATTCTCATTGGCATTAA 61311741
61311740 GAAAGGCACCTACATGTATTTCACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT 61311681
61311680 TCCCTATAGATTAAAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCCTTTGTCATAAA 61311621
61311620 TTTTCATATTCATAAAAGGTGAGTGTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC 61311561
61311560 AAATACTAACCACAGAGGGAAAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTTAGGATCTCACCC 61311501
61311500 TTCAATTCACAGACACACACAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCCTCTAGGAACACAGGT 61311441
SCCA2-R
61311440 AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC 61311381
61311380 TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTACTTATTCTGCCAG61311321

```

Ekzon 1

Şekil 3.3. SCCA2 geni promotor bölgesi genotiplenmesinde kullanılan ileri ve ters primerler yeşil ile betimlenmiştir. *BsaI* enzimi için doğal kesim noktası olmadığından kısmi yanlış-eşleme (partial mismatch) primer tasarlanarak enzim için kesim noktası oluşturulmuştur (bu bölge sarı ile betimlenmiştir). SCCA2 geninin ekzon 1 bölgesi kırmızı ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>).

3.7.1. PZR Koşulları

Astımlı ve sağlıklı bireylere ait DNA örnekleri kontrollerden alınan DNA örnekleri 1. basamakta SCCA2- F, SCCA2- R; 2. basamakta SCCA proF1, SCCA2 BSA1R primerleri kullanılarak amplifiye edildi .

1. basamak PZR koşulu

95 ⁰ C	45''	} 35 döngü
60,5 ⁰ C	45''	
72 ⁰ C	60''	

1. basamak PZR sonucu = 1295 baz çifti

2. basamak PCR koşulu

95 ⁰ C	30 ''	} 38 döngü
58 ⁰ C	30''	
72 ⁰ C	45''	

2. basamak PZR sonucu = 249 baz çiftidir.

3.7.2. *Bsa*I Enzimi Kesim Koşulları

İkinci basamak sonunda elde edilen amplifikasyon ürünleri (249 bç) *Bsa* I enzimi ile aşağıda verilen koşullarda kesildi.

Amplifikasyon ürünü	10 µl
10 X Tampon	2 µl
<i>Bsa</i> I Restriksiyon Enzimi	0,6 µl
H ₂ O	7,4 µl
Toplam Hacim	20 µl

Reaksiyon karışımı 37°C'ye ayarlı etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 6X durdurma tamponundan (% 40 sukroz, % 0,25 brom fenol mavisi, % 60 10XTBE tamponu) her reaksiyon tüpüne 2 µl eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve *Bsa* I kesimi sonucunda elde edilen ürünler % 4'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezleri gerçekleştirildi.

3.8. Kandan Eozinofil İzolasyonu ve Kültürü

Proje ekibinde görev alan gönüllü kişilerden alınan kan örneklerinden Histopaque 1077 (H1077) ve 1119 (H1119) kullanılarak periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) ve polimorfonükleer hücreler (PMN) olarak ayrıldı. Elde edilen PMN hücreleri sayılarak uygun yoğunlukta CD16 (Mouse monoclonal) antikoru ile işaretlendi ve DYNAL biotech firmasının Dynabead Pan Mouse IgG sistemi kullanılarak negatif seçilim ile eozinofil izolasyonu yapıldı.

Periferik kandan izole edilen eozinofiller 750×10^3 /ml olacak şekilde %10 FBS (fetal bovine serum) ve penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri içersine konuldu ve IL-4, IL-13, IL5 ve bunların kombinasyonu ile 24 saat süreyle uyarıldı.

24 saat sonra RNeasy mini kiti kullanılarak (Qiagen GmbH.D-40724, Hilden) RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'lar IMPromp II Rivörs Trankriptaz kiti (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak cDNA'ya çevrildi ve Şekil 3.4 üzerinde gösterilen ileri ve ters primerler kullanılarak eozinofillerde SCCA1 gen ifadesi araştırıldı (Şekil 3.4).

SCCA1 Geni Chromosome:GRCh37:18:61321931:61330697:-1

61324697	ACAAGCCATTTGTAGCTTGTGTAAGACTCTTTTATTCTTTCCCTTGCAGAAAAATTA	61324638	} Ekzon 6
61324637	AAAACCTAATTCTGAAGGTAATATTGGCAGCAATACCACATTGGTTCCTGTGACGCAA	61324578	
SCCA1 1-6S			
61324577	TCTATTTCAAAGGGCAGTGGGAGAAGAAATTAATAAAGAAGATACTAAAGAGGAAAAAT	61324518	} Ekzon 7
61324517	TTTGGCCAAACAAGGTATTTGTCTATATTTTATTATATAATGTAATATGTTAATAAATTT	61324458	
61324457	AAACATTTCTGATGGAATGTACCATGACAAGTAAAAAATAAAATGTTTCATGTCTGTTTT	61324398	
61324397	TTTGTGTGTTTTAGTCTTATAACTTTATTTAGTTAGGAATTCCTGAAGAAGCTATGTCTC	61324338	
61324337	TAACTCATTACATTCTTGGATTATTTCTTAAAAGAAGGATGTGTTGATATCTCAATAATA	61324278	
61324277	TTATCTTTTGCCTTGTGTCTCCTGGTATTTGTTGGACACATGATTATTGTAGAAT	61324218	
61324217	ACATACAAGTCCATACAGATGATGAGGCAATACACATCTTTTCATTTTGCCTCGTGGAG	61324158	
61324157	GATGTACAGGCCAAGGTCTGGAAATACCATACAAAGGCAAAGATCTAAGCATGATTGTG	61324098	
61324097	TTGCTGCCAAATGAAATCGATGGTCTCCAGAAGGTAAGAACTTGCATCTACAACCTTCC	61324038	
61324037	TTCTACTGCCTGCATTTTCCAAAGATACCAAGTTTAAACAAGGTAAGCTGGTGACC	61323978	
61323977	GAGTTGCCTCAAATAATGAAAAATTTCAAATGAGGAATGATGACTCACCTTCATATTAC	61323918	
----- İNTRON BÖLGESİ-----			
61323437	GAATAATAATATCTAATAAAGTGAACCTTCTGTATTTACATTTGTTGCCAAAATAAGGA	61323378	} Ekzon 8
61323377	TTCTCCACATAGTCAATTCATTGTTAAGGTGTATTAGAAATCAACAGTTAGTCATATCAG	61323318	
61323317	TTTCTTTTTTCCATTTGTATAGCTTGAAGAAACTCACTGCTGAGAAATGATGGAATG	61323258	
61323257	GACAAGTTTGCAGAATAAGAGAGACACGTGTCGATTTACACTTACCTCGGTTCAAAGT	61323198	
61323197	GGAAAGAGAGCTATGACCTCAAGGACACGTTGAGAACCATGGGAATGGTGGATATCTTCAA	61323138	
61323137	TGGGATGCAGACCTCTCAGGCATGACCGGGAGCCGCGTCTCGTGTATCTGGAGTCCCT	61323078	
61323077	ACACAAGGCCTTTGTGGAGGTTACAGAGGAGGGAGCAGAAGCTGCAGCTGCCACCGCTGT	61323018	
61323017	AGTAGGATTCGGATCATCACCTACTTCACTAATGAAGAGTTCATTGTAATCACCCCTTT	61322958	
61322957	CCTATTCTTCATAAGGCCAAAATAAGACCAACAGCATCCTCTTCTATGGCAGATTCTCATC	61322898	
SCCA ½ ortak 8AS			
61322897	CCCGTAGATGCAATTAGTCTGTCACTCCATTTGGAAAATGTTTCACCTGCAGATGTTCTGG	61322838	
61322837	TAAACTGATGCTGGCAACAACAGATTCCTTGGCTCATATTTCTTTCTTCTCATCTT	61322778	
61322777	GATGATGATCGTCATCATCAAGAAATTAATGATTAAAATAGCATGCCTTCTCTCTTTCT	61322718	
61322717	CTTAATAAGCCACATATAAATGTACTTTTTCTCCAGAAAATTTCTCCTTGAGGAAAAA	61322658	

Şekil 3.4. SCCA1 geni ekzon 6,7 ve 8 bölgeleri kırmızı ile betimlenmiş, kullanılan ileri ve ters primerler yeşil ile betimlenmiştir (<http://www.ensembl.org>).

PZR'de kullanılan başlangıç materyallerinin eşit olduğunu göstermek için kontrol gen olarak siklofilin (Cyclophillin) geni (house keeping gen) kullanıldı.

3.9. Hücre Canlılığı ve Kontrollü Hücre Ölümünün Ölçümü

SCCA1 proteini hücre içi bir proteindir ve hücrede bilinen bir reseptöre sahip değildir. Hücre içerisine alınmasında aktif bir mekanizma olmadığından; SCCA1 proteininin A549 akciğer epitel hücrelerinde hücre ölümü üzerine olan etkisini gösterebilmek amacıyla pcDNA ifade vektörüne klonlanmış pcDNA- SCCA1 vektörü kullanıldı (Bu vektör Dr. Şule Çataltepe, Brigham and Women Hospital Boston, USA, tarafından sağlanmıştır). Transfeksiyonun etkinliği ve SCCA1

proteininin A549 hücrelerinde ifade olduğu Western blot yöntemi kullanarak belirlendi.

3.9.1. Lipofektamin ile Transfeksiyon

pcDNA-SCCA1 ifade vektörü, insan alveolar epitel hücre hattı A549 içerisine kationik lipid bazlı transfeksiyon ajanı lipofektamin kullanılarak sokuldu. MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] yöntemi ile hücre canlılığının ölçülmesi için 96 kuyucuklu, Anneksin V yöntemiyle apoptoz ölçümü için ise 24 kuyucuklu hücre plakları kullanıldı.

3.9.2. SCCA1 Proteininin Western Blot ile Ölçülmesi

1-Hücreler parçalandıktan sonra sitoplazmik protein özütlenmesi gerçekleştirildi ve Bradford protein miktar tayin yöntemi ile protein miktarı ölçüldü.

2 -Örnekler SDS- PAGE'de yürütüldü ve Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrana transferi gerçekleştirildi.

3-Transfer sonunda membran 1 saat oda ısısında % 0.1 Tween 20 ve %5 yağsız süt içeren TBS tamponu içerisinde bloklandı.

4- 1/1000 sulandırılmış insana karşı geliştirilmiş birincil antikor (Mouse Anti-Human) ile (AbCam, MA /USA) gece boyu 4 °C'de inkübe edildi.

5- Membran yıkandı ve 1/1000 kez sulandırılmış ikincil antikor (Vector Lab, CA/USA) ile 1 saat süreyle inkübe edildi.

6- Membran yıkandı ve Kodak marka membran görüntüleme cihazıyla bantların görüntüsü alındı.

3.9.3. MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] Yöntemi Kullanarak H₂O₂ ile Uyarılmış Hücrelerde SCCA1'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 hücreleri 96 kuyucuklu hücre plakalarına her bir koşul için 4'er tekrar olacak şekilde yayıldı. Plaklar %80-90 oranında kaplandığında, hücreler pcDNA- SCCA1 ifade vektörü ile transfekte edildi ve IL-4 ve IL-13 sitokinleriyle ile uyarıldı. Transfekte edilmiş ve edilmemiş A549 hücreleri farklı yoğunlukta H₂O₂ (125, 250, 500 µM) ile uyarıldıktan sonra hücre canlılığı MTT indirgeme yöntemi kullanılarak belirlendi. Bunun için aşağıda detayları belirtilen basamaklar izlendi:

- 1- Hücre süpernatantları uzaklaştırıldı ve hücreler 1XPBS ile yıkandı.
- 2- Hücrelerin üzerine 5 mg/ml yoğunlukta 13 µl MTT konuldu ve hücreler %5 CO₂'li etüvde 2 saat bekletildi. Mikroskopta formazon kristallerinin varlığı kontrol edildi.
- 3- İnkübasyondan sonra plaka ters çevrilerek bütün kuyucuklar boşaltıldı.
- 4- Her bir kuyuya 100 µl izopropil alkol konuldu.
- 5- 570 nm ve 655 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

3.9.4. Anneksin (Annexin) V-FITC/ 7-AAD ile Kontrollü Hücre Ölümünün (Apopitoz) Ölçümü

Kontrollü hücre ölümünü ölçmek için kullanılan yöntemlerden biri de negatif yüklü bir fosfolipit olan ve plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serinlerin (PS) ölçülmesidir. Apopitozun erken evrelerinde membranın bütünlüğü korunmaktadır ancak membran fosfolipitlerinin asimetrisi bozulmaktadır. Hücrelerin apopitoza girmesiyle birlikte, fosfolipitler hücrenin dış yüzeyinde

belirmeye başlarlar. Bu da makrofajlara apoptotik hücrelerin tanınması ve uzaklaştırılması için sinyal oluşturur (Martin, et al., 1995). 7-amino aktinomisin D (7-AAD) gibi canlılığı belirleyen boyalar kullanılarak apoptozun erken - geç fazları ve nekrotik hücreler arasında ayırım yapmak mümkün olabilmektedir (Schmid et al., 1994)

Anneksin V, fosfolipitlere özellikle de fosfatidilserinlere bağlanan Ca^{2+} bağımlı bir proteindir. Anneksin FITC (Floresin izotiyosiyanat) ile konjuge edilir. Bu anneksinin PS'ye bağlanmasını değiştirmez (Tait et al., 1989; Andree et al., 1990; Raynal and Pollard, 1994).

Aşağıda belirtilen yöntem takip edilerek hücrelerde apoptoz ölçüldü.

1- Hücre süspansiyonu santrüfuj edilip supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 1 X bağlanma tamponu ile ml'de 5-10 milyon hücre olacak şekilde çözüldü. Tüpler buzda bekletildi.

2- Anneksin V-FITC solüsyon ve canlılık tespiti için kullanılan boya 7-AAD hücre süspansiyonununun 100 µl'sine ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı.

3- Buz üzerinde ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.

4- Üzerine 400µl 1X Bağlanma Tamponu ilave edildi ve karıştırıldı.

5-Örnekler 30 dakika içerisinde akım sitometri ile analiz edildi.

3.10. MUC5AC (Musin 5 Alt tip AC) İfadesinin A549 Hücrelerinde RT-PZR Yöntemiyle Ölçümü

A549 hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarına yayıldı ve hücreler plak tabanını % 90-95 oranında örtene kadar beklendi. SCCA1 vektörü ile transfekte edilen ve IL4+IL13 ile uyarılan hücreler, 24 saat sonunda 200 µM nötrofil elastaz ile uyarıldı. 24 saat sonunda hücrelerden RNA izole edildi (RNeasy, Qiagen GmbH.D-40724, Hilden, Almanya). Elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildi (ImPromp II Reverse Transcriptase Kit, Promega, Madison, WI, USA) ve RT-PZR deneyi gerçekleştirildi.

Kalıp RNA miktarlarını eşitlemede kontrol gen (house keeping) olarak siklofilin geni kullanıldı. Örnekler agaroz jel üzerinde elektroforez uygulandı ve görüntünün analiz edici sistemde (Syngene Gene Genius) resimleri çekilerek bant yoğunlukları Gene Tools Analysis Software 3.02.00 (Synoptecs) programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Genotip dağılımının Hardy-Weinberg dengesine uygunluğu Ki kare yöntemi ile kontrol edildi. Sonuçlar Ki-kare, Mann-Whitney U test ve tek yönlü ANOVA kullanılarak SPSS 16.0 programında değerlendirildi.

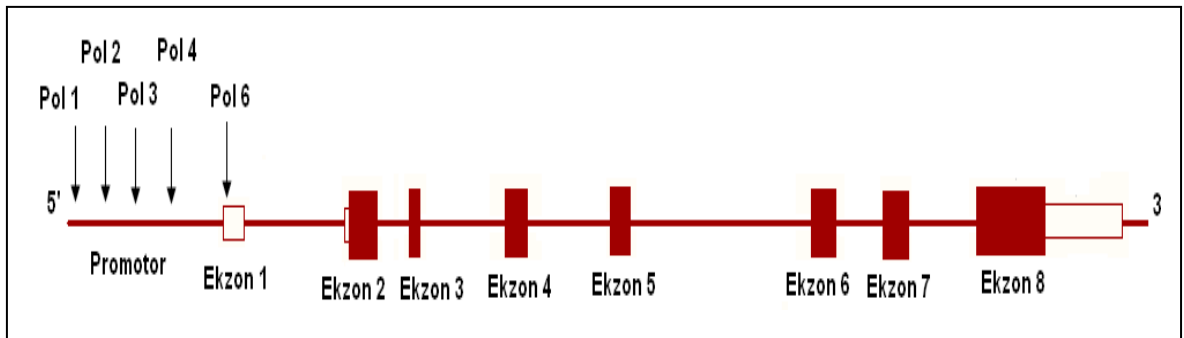
4.SONUÇLAR

SCCA1 ve SCCA2 genlerine ait promotor, 5' UTR ve ekzon 1 bölgeleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi yöntemi ile araştırılmıştır. Frekansı %10'un üzerinde bulunan tek nükleotit değişikliklerinin astımlı ve sağlıklı bireylerden oluşan gruplardaki sıklıkları PZR-Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism) ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

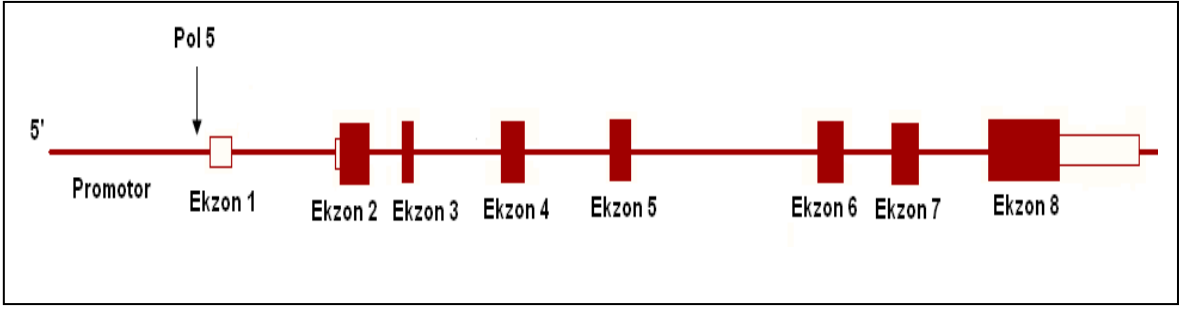
DNA dizi analizi sonucunda tanımlandığımız polimorfizmlerin bir kısmı daha önce tanımlanmamıştır. Sekans verilerine bakıldığında bu polimorfizmler için verilmiş referans sekans (rs) numaraları bulunmamaktadır. Değişik kaynaklarda (NCBI, ENSEMBL gibi) ve yayınlarda SCCA genlerinin 5' UTR ve promotor bölgelerinin nükleotit dizilimlerinin farklı numaralandırılması söz konusudur. Karışıklığa meydan vermemek amacıyla bulunan polimorfizmler DNA dizilimlerini gösteren sekans motifleri şeklinde gösterilmiştir.

Örnek olarak; SCCA1 promotor bölgesinde yer alan bir polimorfizm;

GTGGCTGCAAGAGAA[A]ATGAGGAAGAAGCAA diziliminde A yerine G nükleotitinin yer alması; GAA[A/G]ATG motifi şeklinde belirtilmiştir. SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor bölgelerinde bulunan toplam 6 polimorfizm uzak promotor bölgesinden genlerin 3' UTR'ına doğru 1, 2, 3 (Pol 1, Pol 2, Pol 3) şeklinde numara verilerek sıralanmışlardır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. SCCA1 geninde bulunan polimorfizmler SCCA1 haritası üzerinde uzak promotordan genin 3' UTR kısmına doğru numaralandırılarak sıralanmıştır.



Şekil 4.2. SCCA2 geninde bulunan polimorfizm SCCA2 haritası üzerinde uzak promotordan genin 3' UTR kısmına doğru numaralandırılarak sıralanmıştır.

Bulunan tüm polimorfizmler ve polimorfizmlerin baz değişimleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. SCCA1 ve SCCA2 genlerinin promotor ve ekzon bölgelerinde bulunan polimorfizmler.

Polimorfizmler ve bulunduğu gen bölgeleri	Polimorfizmlerin üzerinde yer aldığı dizilim
Pol-1 Promotor-SCCA1	GTGGCTGCAAGAGAA[A/G]ATGAGGAAGAAGCAA
Pol-2 Promotor-SCCA1	AAAGAAGAAACCCCT[A/G]ATAAACCCATTGGATC
Pol-3 Promotor-SCCA1	CCCTAATAAACCCAT[T/C]GGATCTCCTGAGACT
Pol-4 Promotor-SCCA1	ATTGGATCTCCTGAG[A/G]CTTATTA ACTATCAT
Pol-5 Promotor-SCCA2	GTTTTGTTTGTGTTG[G/T]TTTTGTTTTGTTTT
Pol-6 Ekzon 1-SCCA1	ATACTAACCCACAGAG[G/A]GAGAGGCAGCAAGAG

4.1 SCCA1 Geni Promotor Bölgesinde DNA Dizi Analizi Sonucunda Tanımlanmış Polimorfizmler

SCCA1 geninin promotor bölgesinde DNA dizi analizi sonucunda dört adet tek nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bu dört polimorfizm %10'dan daha yüksek sıklıkta bulunmakta ve birlikte kalıtılmaktadır. Bu polimorfizmlerin birbirine bağlı kalıtıldığını doğrulamak amacıyla 20 astımlı, 20 sağlıklı bireyin dizi analizlerine ilave olarak 50 astımlı ve 50 sağlıklı bireyin DNA dizi analizleri yapılmış ve polimorfizmin birbiri ile bağlantılı olduğu yani birlikte kalıtıldığı belirlenmiştir.

SCCA1 promotor bölgesinde bulunan birbirine bağlı polimorfizmler sırasıyla motif yapılarıyla birlikte Pol 1- GAA[A/G]ATG (SCCA1- Şekil 4.3), Pol 2-CCT[A/G]ATA (SCCA1-Şekil 4.4), Pol 3- CAT[T/C]GGA (SCCA1-Şekil 4.5), Pol 4- GAG[A/G]CTT (SCCA1-Şekil 4.6) olarak verilmiştir.

Polimorfizm 1 (SCCA1- Promotor)

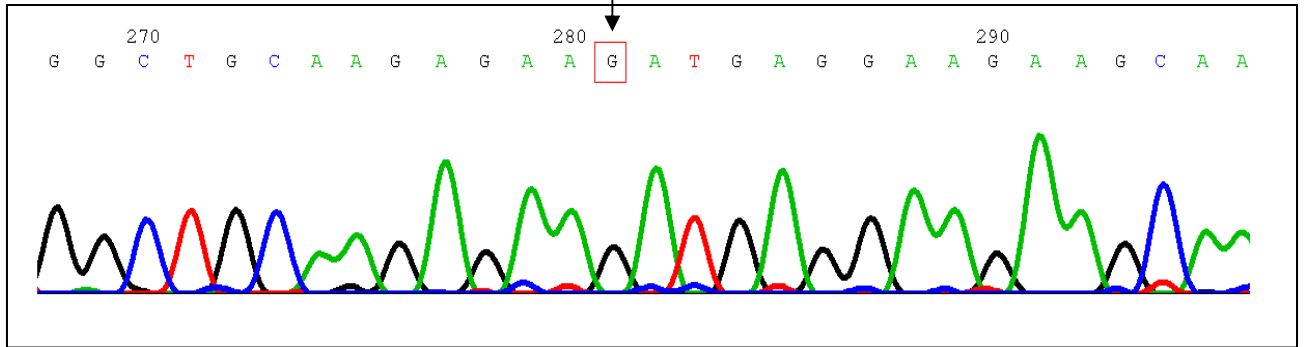
GTGGCTGCAAGAGAA[A/G]ATGAGGAAGAAGCAA

A->G

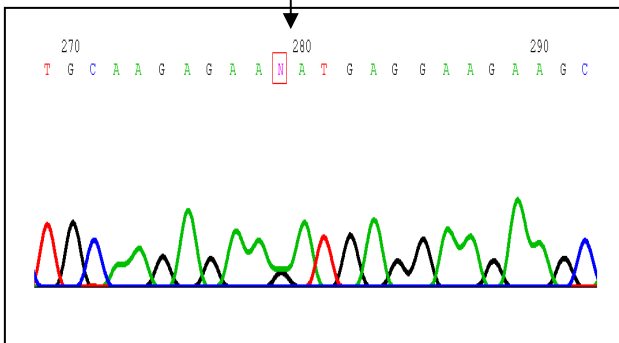
CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTTCTTTTTCTGCTTAATTTTTA
AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
TGTCAGCCTGTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACTG
AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTTCACGCTGATTGGGGAGGCCCTC
AGAATCACGGTAGGAGGCCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAATGAGGAA
GAAGCAAAAAGAAGAAACCCCTAATAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAECTATCA
TGAGAATAGCACAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
AACACATGTGGAATTTCTGTTAGATACAATTCAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTACTGGTAGGATCACTGCCAAGCTGAGC
ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTACTGCTGACTTGCACTTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCTTTGTGCATAAA
TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCCAGAGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCAATTCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTTACTTATTCTGCCAG
AGCAAAATTA AAATACCTATTTTCATCTGATTTGTCTTTATCTAAATTGCTTAGTTCCAA
GTAAACCAAGGCACTTTTAGGAACACAGAGGGAGAGTGCCTTGCAGCCAGAGAGTCTTGA

Ekzon 1

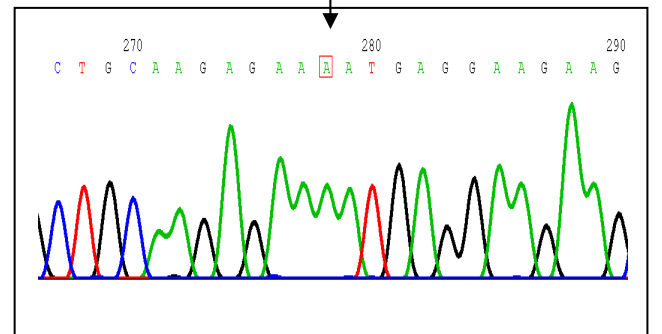
Homozigot



Heterozigot



Normal



Şekil 4.3. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 1 (Pol1).

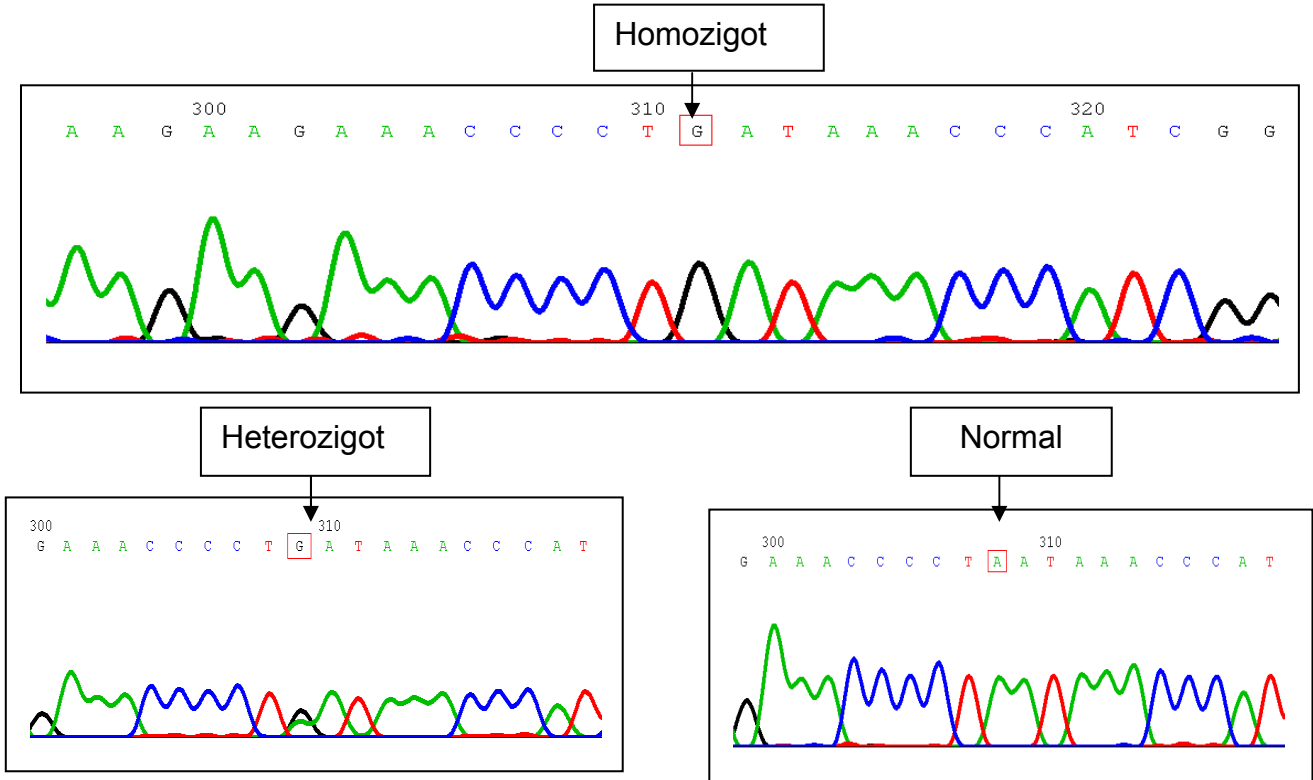
Polimorfizm 2 (SCCA1- Promotor)

AAAGAAGAAACCCCT[A/G]ATAAACCCATTGGATC

A->G

CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTTCTTTTTCTGCTTAATTTTTA
 AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
 TGTCAGCCTGTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG
 AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTTCACGTGATTGGGGAGGCCCTC
 AGAATCACGGTAGGAGGCAAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAATGAGGAA
 GAAGCAAAAAGAAGAAACCCCTATAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAECTATCA
 TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
 AACAACATGTGGAATTCTGGTAGATACAATTCAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
 CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
 ATCTGGGATGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
 ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
 CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
 TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
 TTTTGTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAAATCCAAGAAAAGAA
 TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
 GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT
 GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
 TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCTTTGTCCATAAA
 TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCCAGAGGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCAATTCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
 AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
 TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTACTTATTCTGCCAG
 AGCAAAATTA AAAATACCTATTTTCATCTGATTTGTCTTTATCTAAATTGCTTAGTTCCAA
 GTAAACCAAGGCACTTTTAGGAACACAGAGGGAGAGTGCTTGCAGCCAGAGAGTCTTGA

Ekzon 1



Şekil 4.4. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 2 (Pol 2).

Polimorfizm 3 (SCCA1- Promotor)

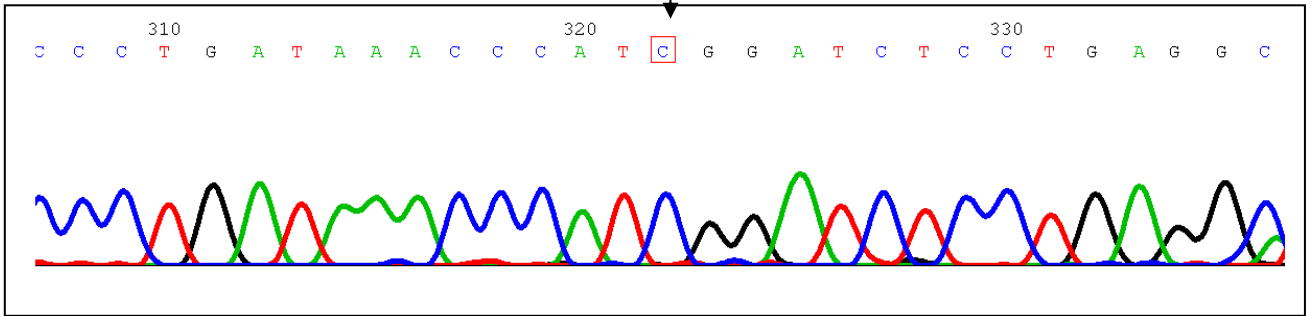
CCCTAATAAACCCAT[T/C]GGATCTCCTGAGACT

T->C

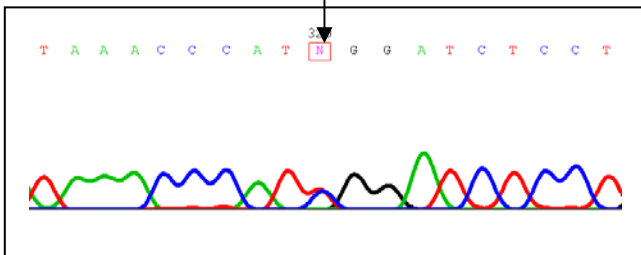
CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTTCTTTTTCTGCCTTAATTTTTTA
AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
TGTCAGCCTGTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACTG
AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTTCACGTGATTGGGGAGGCCTC
AGAATCACGGTAGGAGGCCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAATGAGGAA
GAAGCAAAAGAAGAAACCCCTAATAAACCCATGGATCTCCTGAGACTTATTAACTATCA
TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
AACACATGTGGAATTTCTGGTAGATACAATTCAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCTTTGTCAATAA
TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCCACAGAGGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCAATTCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCCTCTAGGAACACAGGT
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTACTTATTCTGCCAG
AGCAAAATTA AAAATACCTATTTTCATCTGATTTGTCTTTATCTAAATTGCTTAGTTCCAA
GTAAACCAAGGCACTTTTAGGAACACAGAGGGAGAGTGCCTTGCAGCCAGAGAGTCTTGA

Ekzon 1

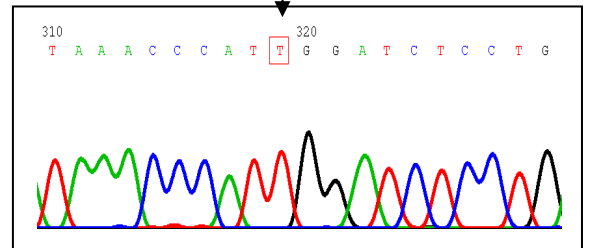
Homozigot



Heterozigot



Normal



Şekil 4.5. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 3 (Pol 3).

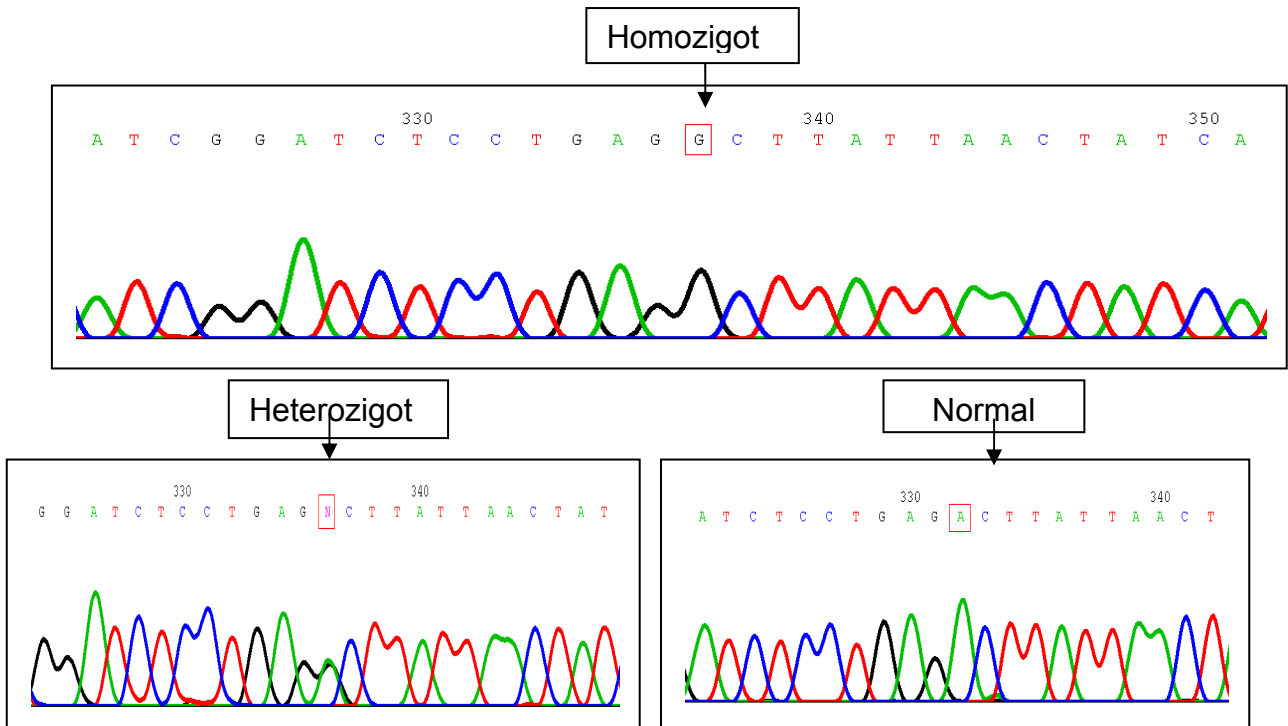
Polimorfizm 4 (SCCA1- Promotor)

ATTGGATCTCCTGAG[A/G]CTTATTAACCTATCAT

A->G

AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
TGTCAGCCTGTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG
AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTCCACGTGATTGGGGAGGCCTC
AGAATCACGGTAGGAGGCAAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAATGAGGAA
GAAGCAAAAGAAGAAACCCCTAATAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAACCTATCA
TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
AACACATGTGGAATTTCTGGTAGATACAATTCAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCCCTTGTGATAAA
TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCCACAGAGGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCAATCCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTACTTATTCTGCCAG

Ekzon 1



Şekil 4.6. SCCA1 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 4 (Pol 4).

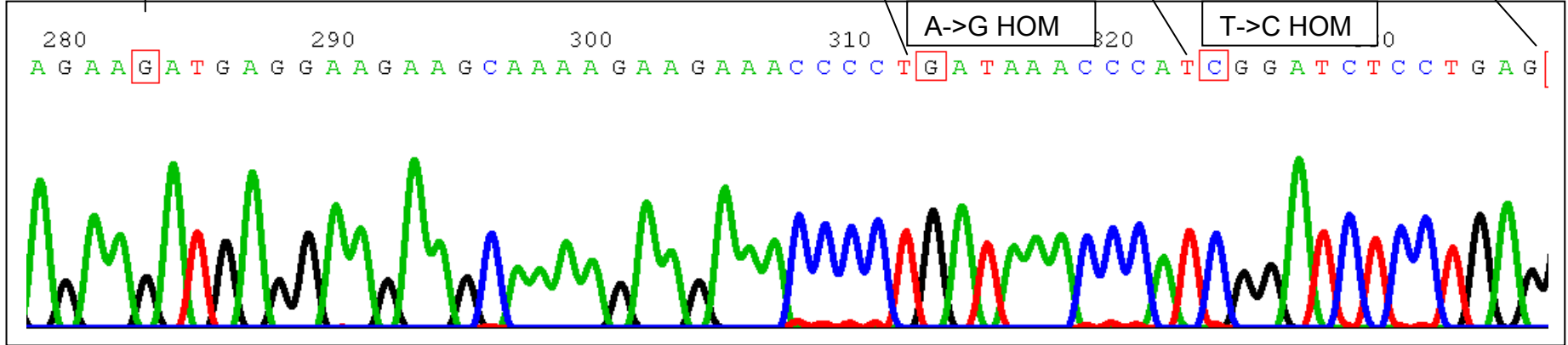
Dört polimorfizmin (Pol1, Pol 2, Pol 3, Pol 4) beraber kalıtıldığı Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmektedir.

CCACCAAGAAACGTTGTGATCCTGACAGGTCAAGCAACTTCTTTTTCTGCTTAATTTTTTA
AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
TGTCAGCCTGTTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG
AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTTCCACGTGATTGGGGAGGCCTC
AGAATCACGGTAGGAGGCCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAATGAGGAA
GAAGCAAAGAAGAAACCCCTAAATAAACCCATGGATCTCCTGAGACTTATTAATCA
TGAGAATAGCACAAGAAAGACCCGCCCCCATGATTCATTACCTCTAAGCTGGGTCCCTCC
AACACATGTGGAAATTCTGGTAGATACAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAAATTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAAGCTGAGC
ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATANTCCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAAGTAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCATAACTTATTCTCATTGGCATT
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAAGTGAATCCTGTCCTTTGTCATAAA
TTTTCGTATTTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACACAGAGGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCACTCACAGACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTACTTATTCTGCCAG
AGCAAAATTAAAATACCTATTTTCATCTGATTTGTCCTTTATCTAAATTGCTTAGTTCCAA

A->G HOM

Ekzon1

A->G HOM



Şekil 4.7. SCCA1 promotor bölgesinde homozigot olarak saptanan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) birlikte kalıtıldığını gösteren DNA dizi analiz sonucu.

AATGAAAAATTAGAAAGCTGACATTCAAAATGGCCCGTCTGTTTCAATTGCTCTTCTCAG
 TGTCAGCCTGTTAACTCAATGTGTTAGTCTGTTTTTCATGCTGCTGATAAAGACATACCTG
 AGATTAGGAAGTAAAAGAGGTTTAATTGGACTTAGAGTTCCACGTGATTGGGAGAGGCCTC
 AGAATCACGGTAGGAGGCCAAAAGTTATTCTTACATGGTGGCTGCAAGAGAAAATGAGGAA
 GAAGCAAAAAGAAGAAACCCCTAATAAACCCATTGGATCTCCTGAGACTTATTAACATCA
 TGAGAATAGCACAAAGAAAGACCCGCCCCCATGATTCATTACCTCTACCTGGGTCCCTCC
 AACACATGTGGAAATTCTGGTAGATACAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
 CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAACTTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
 ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
 ATTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTAATCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
 CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT
 TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
 TTTTGTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCATAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA
 TGGTGGGGTTTTTGTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
 GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT
 GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCCGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
 TCCCTATAGATTA AAAAGGAGGTACAATGGTAGAAGTGAATCCTGTCTTTGTCATAAA
 TTTTCGTATTCATAAAGGTGAGTGTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCCAGAGGGGAGAGGCAGCAAGAGCAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC
TTCATTCCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
 AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTTTGGAGAATAATAATGATAC
 TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTACTTATTCTGCCAG

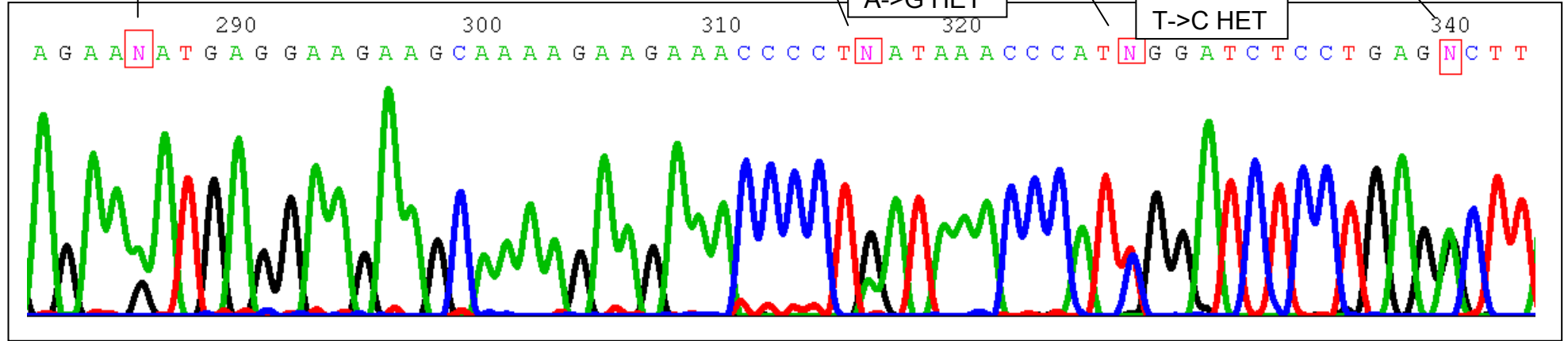
A->G HET

A->G HET

T->C HET

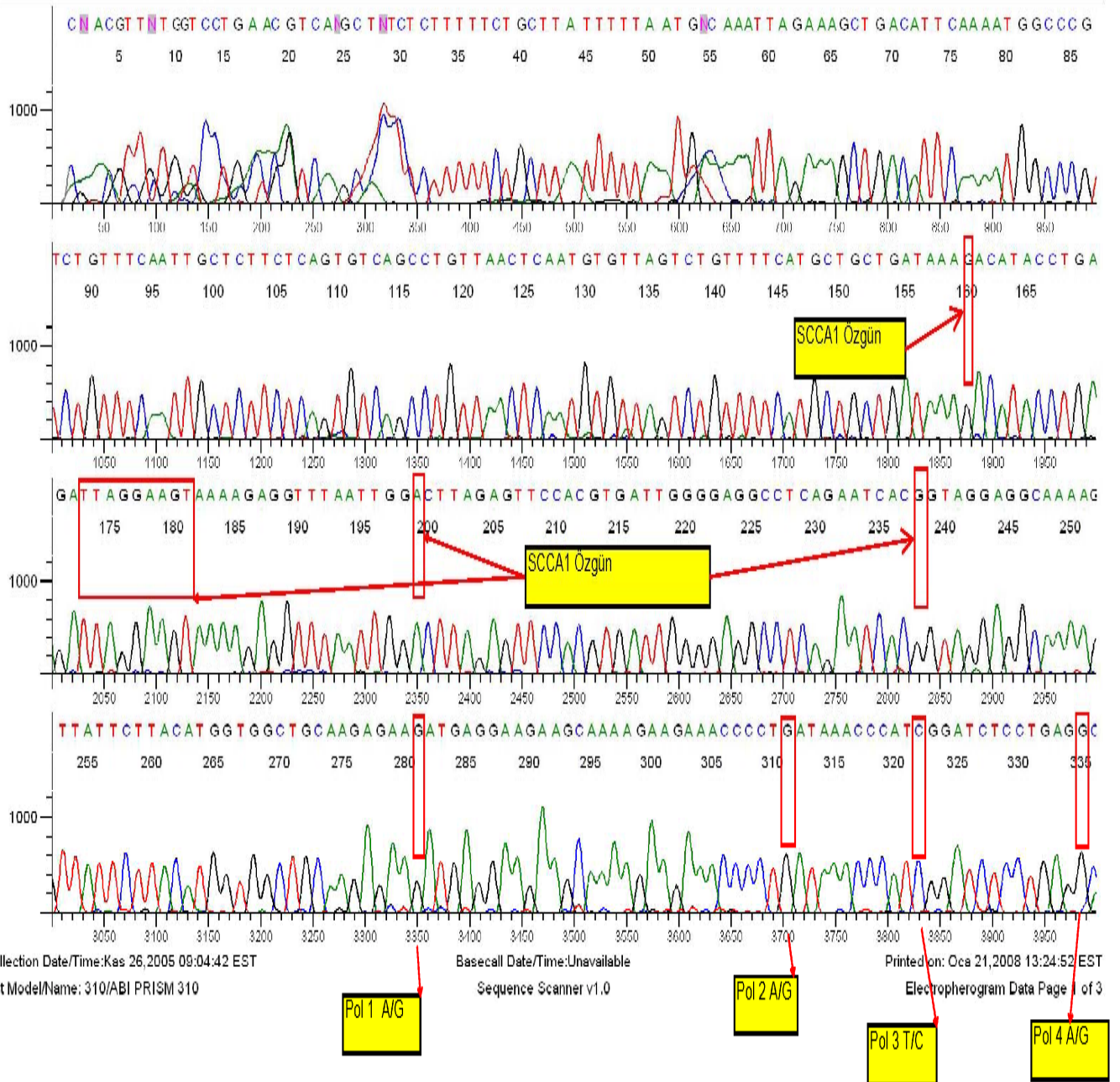
A->G HET

Ekzon



Şekil 4.8. SCCA1 promotor bölgesinde heterozigot olarak saptanan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) birlikte kalıtıldığını gösteren DNA dizi analiz sonucu.

Polimorfizmlerin bulunduğu noktadaki nükleotit değişiklikleri iki genin birbirlerinden farklılık gösterdiği bölgelerde olmuştur ve SCCA genlerinden birindeki nükleotit diğer gende bulunan nükleotide dönüşmüştür. Bu nedendir ki dizi analizi yapılan örneğin doğru gene ait olduğunu kanıtlamak yani SNP'ler dışında iki gen arasında farklılık gösteren dizileri göstermek çok önemlidir. Yapılan dizi analizi sonuçlarının özgünlüğü Polimorfizm 1,2,3 ve 4 için Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. SCCA1 promotor bölgesinde bulunan 4 polimorfizmin (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) beraber kalıtıldığını ve SCCA1genine özgün olduğunu gösteren DNA dizi analiz sonucu.

4.2 SCCA2 Geni Promotor Bölgesinde DNA Dizi Analizi Sonucunda Tanımlanan Polimorfizm

SCCA2 geninin promotor bölgesinde sıklığı %10'un üzerinde bir adet tek nükleotit polimorfizmi gösterildi (Şekil 4.10). Pol 5 olarak adlandırılan ve G/T polimorfizmi TTG[G/T]TTT motifine sahiptir.

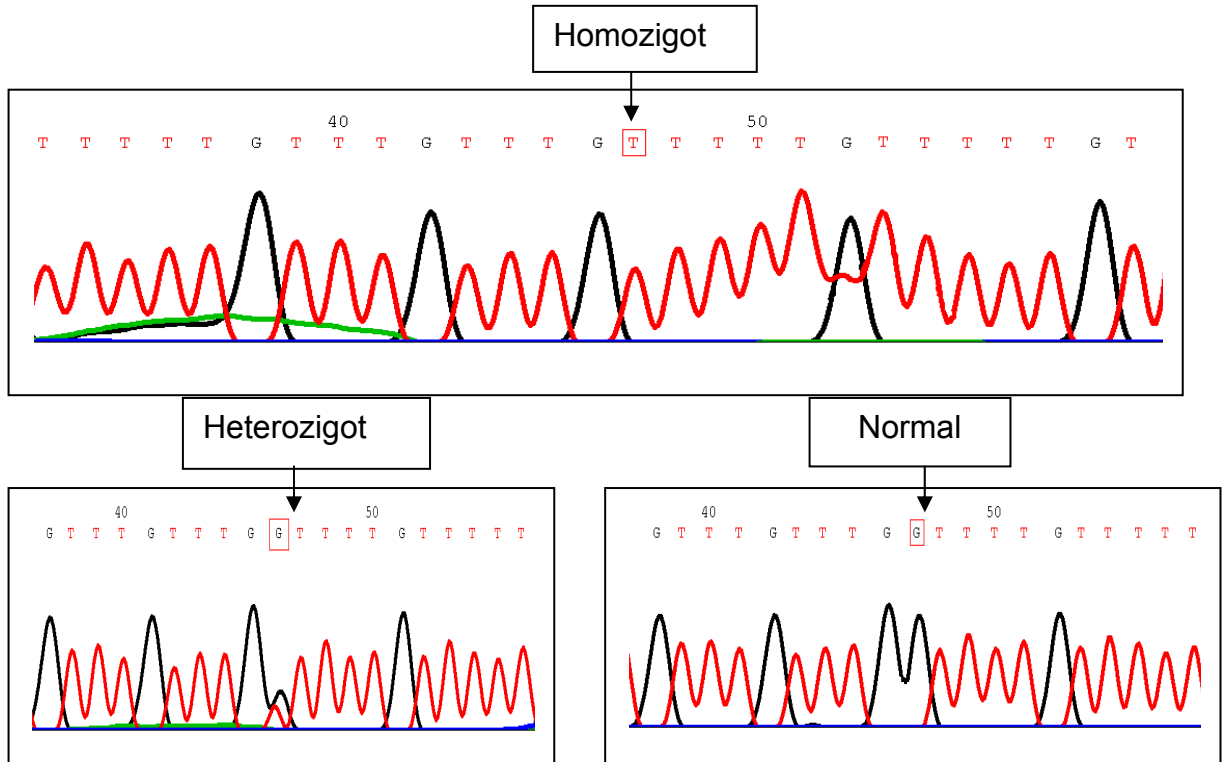
Polimorfizm 5 (SCCA2-Promotor)

GTTTTGTTTGTGTTG[G/T]TTTTGTTTTTTTT

```
GAAGCAAAGAAGAAACCCCTGATAAACCCATCGGATCTCCTGAGGCTTATTAAGTATCA
TGAGAATAGCACAAGAAAGACCGGCCCCCATGATTCAATTACCTCTACCTGGGTCCTCC
AATAACATGTGGAATTCTGGTAGATACAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGGGAACACAGC
CAAACCATATCACTCAGCAAGGCAGATAAATTTCTCACTGAGCCTATGCAACAGAAAACC
ATCTGGGATGGTTGTAAGGGGCACAGGAAGTGACTGGTAGGATCACTGCCAAAGCTGAGC
ACTCAGGAGAAGGCAATAGAATCCTATTCTCCATAGTATGCTATAAGATACTGAAGTACA
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTACATTCCTTGTATACAGAAAAAT
TACTAAGGAAAATTCATAGGATGACAAAAACTTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAAATCCAAGAAAAGAA
TGGTGGGGTTTTTTGTTTGTTTGGTTTTTTTGTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCTAAACTTATTCTCATTGGCATTGA
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTGACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT
TCCCTATAGATTAATAAAGGAGGTACAATGGTAGAACTGTAATCCTGTCCTTTGTCATAAA
TTTTCATATTCATAAAGGTGAGTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC
AAATACTAACCACAGAGGGAAAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTAGGATCTCACCC
TTCATTCCACAGACACACAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTACTTATTCTGCCAG
```

G->T

Ekzon 1



Şekil 4.10. SCCA2 geni promotor bölgesinde bulunan Polimorfizm 5 (Pol 5).

4.3. SCCA1 Geni 1. Ekzonunun DNA Dizi Analiz Sonucu

DNA dizi analizi sonucunda, 1 astımlı hastanın SCCA1 geni ekzon 1 bölgesinde daha önce tanımlanmamış bir SNP bulundu (Şekil 4.11). Pol 6 olarak adlandırılan G/A polimorfizmi GAG[G/A]GAG motifine sahiptir. Bu bölge Ensembl verilerinde (www.ensembl.org) ekzon 1 içerisinde gösterilirken; Hamada ve arkadaşlarının çalışmasında promotor bölge içerisinde gösterilmiştir (Hamada et al., 2001).

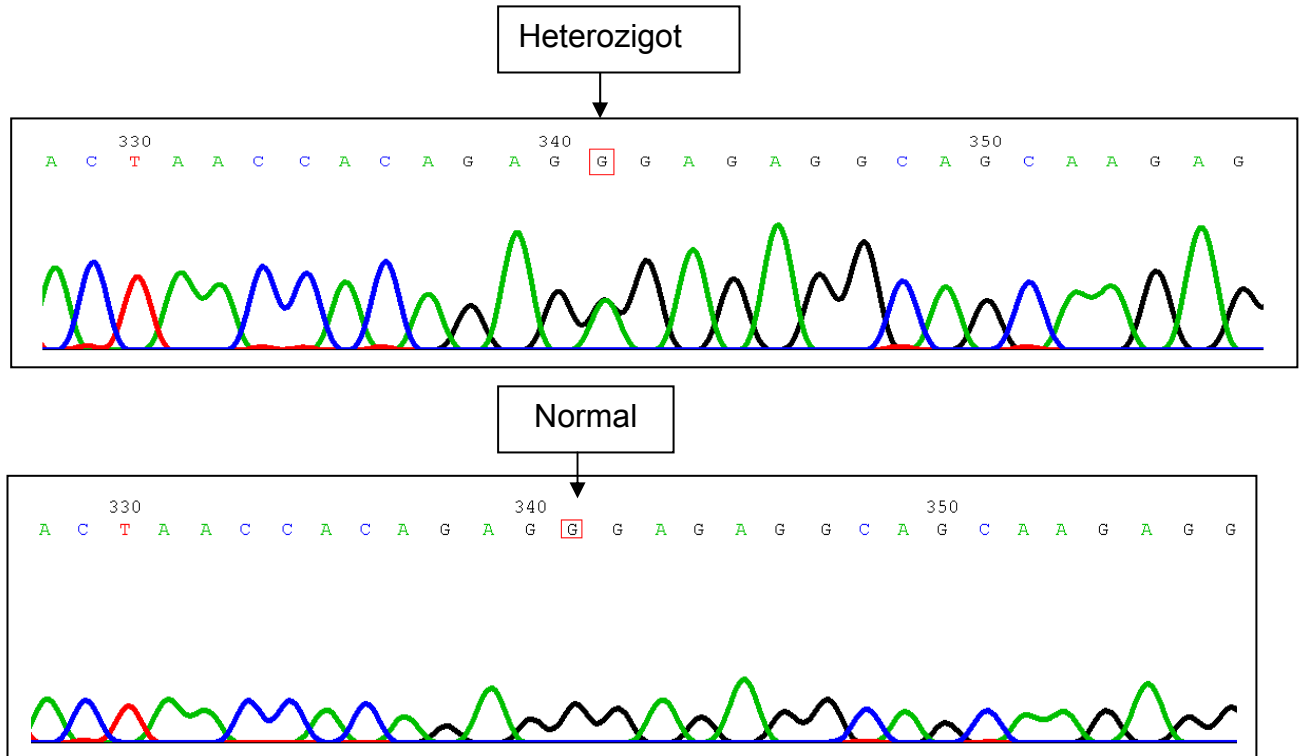
Polimorfizm 6 (SCCA1-Ekzon 1)

ATACTAACCACAGAG[G/A]GAGAGGCAGCAAGAG

```
CTTCTTCACTATCTCTTTGGACTTAGAATTAGCACTATATTCCTTGTATACAGAAAAAT  
TACTAAGGAAATTCATAGGATGACAAAACTTTCAGAACTGAAAAACAGGAAATGTAAGC  
TTTTTAGTTCTTTGGTATTTCGAAGTATGCCTAAAAGACAATGCAAAATCCAAGAAAAGAA  
TGGTGGGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGCTGGAGTAGAATACAAAG  
GGATGGAGTTGAAACAAATGAGAGGAAATTGGAATTCTAACTTATTCTCATTGGCATT  
GAAAGGCACCTACATGTATTTACATGAGCCGGTACTGCTGACTTGCATTCTTATTTTT  
TCCCTATAGATTAAAAAGGAGGTACAATGGTAGAAGTGAATCCTGTCCCTTTGTGCATAAA  
TTTTCGTATTCATAAAGGTGACTGTTAGCCCGCTTGTGAAATCTGAAGTTGAGTAACTTC  
AAATACTAACCACAGAGGAGAGGCAGCAAGAGGAGAGGCATAAATTCAGGATCTCACCC  
TTCATTCCACAGACACACATAGCCTCTCTGCCACCTCTGCTTCTCTAGGAACACAGGT  
AAGAGCTTCAAGCCTCTCCAGCTTAATAACATGAATTATTTTTGAGAATAATAATGATAC  
TGTGTTCTATATCATGCATCTCCTGCATTCTGTCTGATTATATTTTACTTATTCTGCCAG  
AGCAAATTTAAATACCTATTTTATCTGATTTGTCCCTTATCTAAATTGCTTAGTTCCAA  
GTAAACCAAGGCACTTTTAGGAACACAGAGGGAGAGTGCCTTGCAGCCAGAGAGTCTTGA
```

G->A

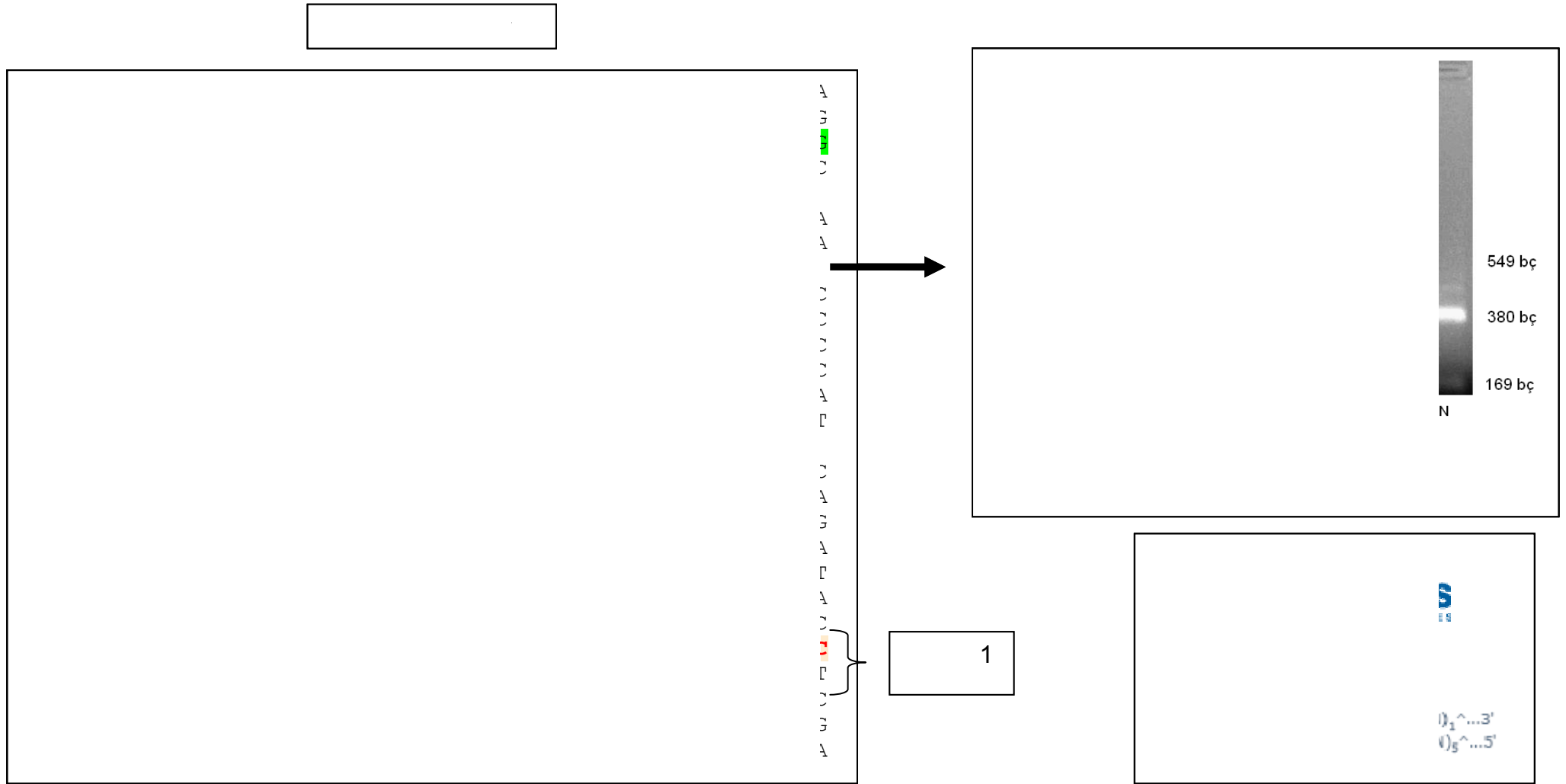
Ekzon 1



Şekil 4.11. SCCA1 geni ekzon 1'de bulunan Polimorfizm 6 (Pol 6).

4.4 SCCA1 Promotor Bölgesinde yer alan Pol 1, Pol 2, Pol 3 ve Pol 4 Polimorfizmlerinin Genotipleme Sonuçları

DNA dizi analiz sonuçları Pol 1, Pol 2, Pol 3 ve Pol 4 polimorfizmlerinin birlikte kalıtıldığını göstermiştir. Bu nedenlerdir ki polimorfizmlerden bir tanesinin genotiplenmesi diğer üç polimorfizmin de genotip sonucunu verecektir. Amplifikasyon primerleri, enzim kesim noktası, enzimin özelliği ve kesim sonrası agaroz jel görüntüsü Şekil 4.12 üzerinde verilmiştir.



Şekil 4.12. SCCA1 geni promotor dizisi üzerinde ileri ve ters amplikasyon primerleri yeşil, *A/w 26 I* kesim noktası sarı ve Pol 4 (A/G) nükleotit değişiklik noktası kırmızı ile betimlenmiştir. PZR ürünün büyüklüğü 549 bç'dir. *A/w 26 I* enzimi normal DNA'yı keser ve 380 ve 169 bç'lik iki parçaya ayırır. Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonucunda oluşan görüntü DNA dizisinin sağ kısmında yer alan agaroz jel elektroforezi resminde gösterilmektedir.

Astımlı ve sağlıklı bireylerin SCCA1 promotör genotipleme sonucunda saptanan polimorfizmler açısından iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Astımlı grup kendi içerisinde atopik ve atopik olmayan şeklinde ayrıldığında, atopik astımlılarda sadece homozigot polimorfizmin görülme sıklığı daha yüksek olarak bulunmuştur (Astımlı ve sağlıklı bireyler arasında genotip sıklıklarında fark bulunamamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Sağlıklı, astımlı, atopik astımlı ve atopik olmayan astımlı bireylerde SCCA1 genotip dağılımı

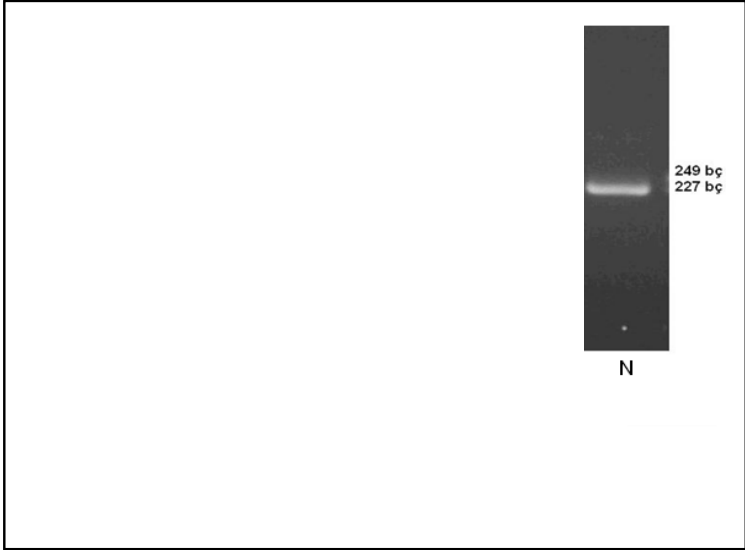
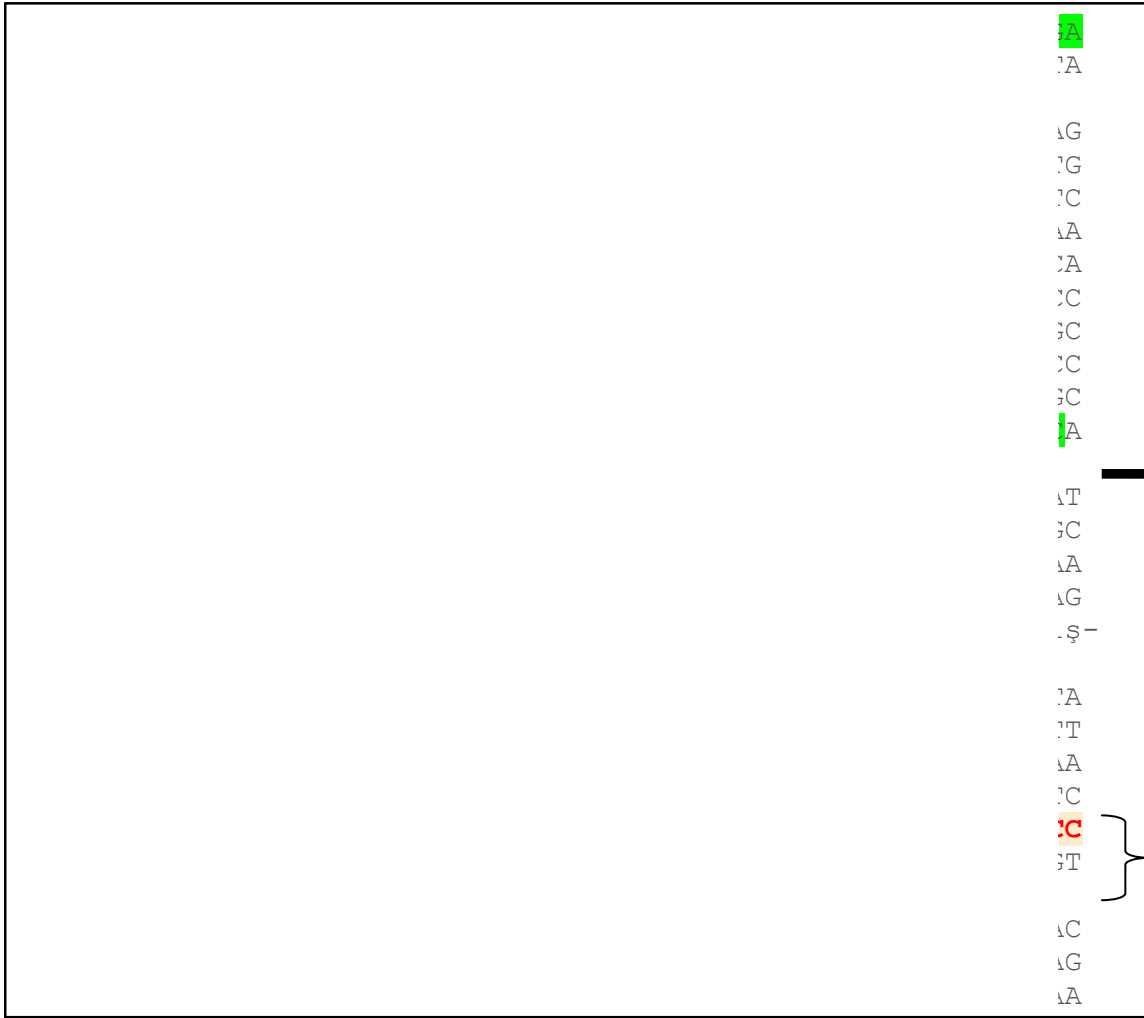
	Sağlıklı	Astım	p
SCCA1 genotipi			
Normal (%)	89 (0,509)	206 (0,479)	>0,05
Heterozigot (%)	69 (0,394)	180 (0,419)	
Homozigot (%)	17 (0,097)	44 (0,102)	
	Atopik (Astımlı)	Atopik olmayan(Astımlı)	
SCCA1 genotipi*			
Normal (%)	112 (0,441)	93 (0,534)	=0,038
Heterozigot (%)	109 (0,429)	70 (0,402)	
Homozigot (%)	33 (0,130)	11 (0,063)	

* : Atopi yönünden değerlendirilmemiş bazı astım hastalarının sonuçları istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.

4.5. SCCA2 Promotör Bölgesinde yer alan Pol 5 Polimorfizminin Genotipleme Sonucu

SCCA2 geninin promotör bölgesinde yer alan Pol 5 polimorfizminin genotipleme sonucunda kullanılan primerler çiftleri, enzim kesim noktası, enzimin özelliği ve enzim kesim görüntüsü Şekil 4.13'de verilmiştir.

si



Pol 5 (G/T)
iliş-eşleme
ç'dir. Bsa I
lan agaroz

Astımlı ve sağlıklı bireylerin SCCA2 genotip sıklıkları arasında bir fark bulunamamıştır. Astımlı grup kendi içerisinde atopik ve atopik olmayan şeklinde ayrıldığında da SCCA2 genotipleri arasında bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Sağlıklı, astımlı, atopik astımlı ve atopik olmayan astımlı bireylerde SCCA2 genotip dağılımı

	Sağlıklı	Astım	p
N	145	177	
SCCA2 genotipi			
Normal (%)	9 (0,062)	12 (0,068)	p>0,05
Heterozigot (%)	55 (0,379)	78 (0,441)	
Homozigot (%)	81 (0,559)	87 (0,492)	
SCCA2 genotipi	Atopik (Astımlı)	Atopik olmayan(Astımlı)	p>0,05
Normal (%)	10 (0,082)	2 (0,036)	
Heterozigot (%)	53 (0,434)	25 (0,455)	
Homozigot (%)	59 (0,484)	28 (0,509)	

4.6. Eozinofillerde SCCA1 İfadesi

Daha önce yapılan çalışmalarda Dr. Şule Çataltepe ve ekibi tarafından lenfoid dokularda SCCA geninin ifade edilmediği gösterilmiştir (Çataltepe et al., 2000). Ancak allerjik inflamasyona özgü Th2 sitokin uyarıları ile karşılaşıldığında astımın anahtar hücresi olan eozinofillerdeki SCCA1 ifadesi bilinmemektedir.

Uyarılmamış eozinofillerden elde edilen RNA'dan RT-PZR tekniği ile cDNA sentezi yapıldı. SCCA1 1-6S ve SCCA ½ ortak 8AS primer çiftleri kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.14).

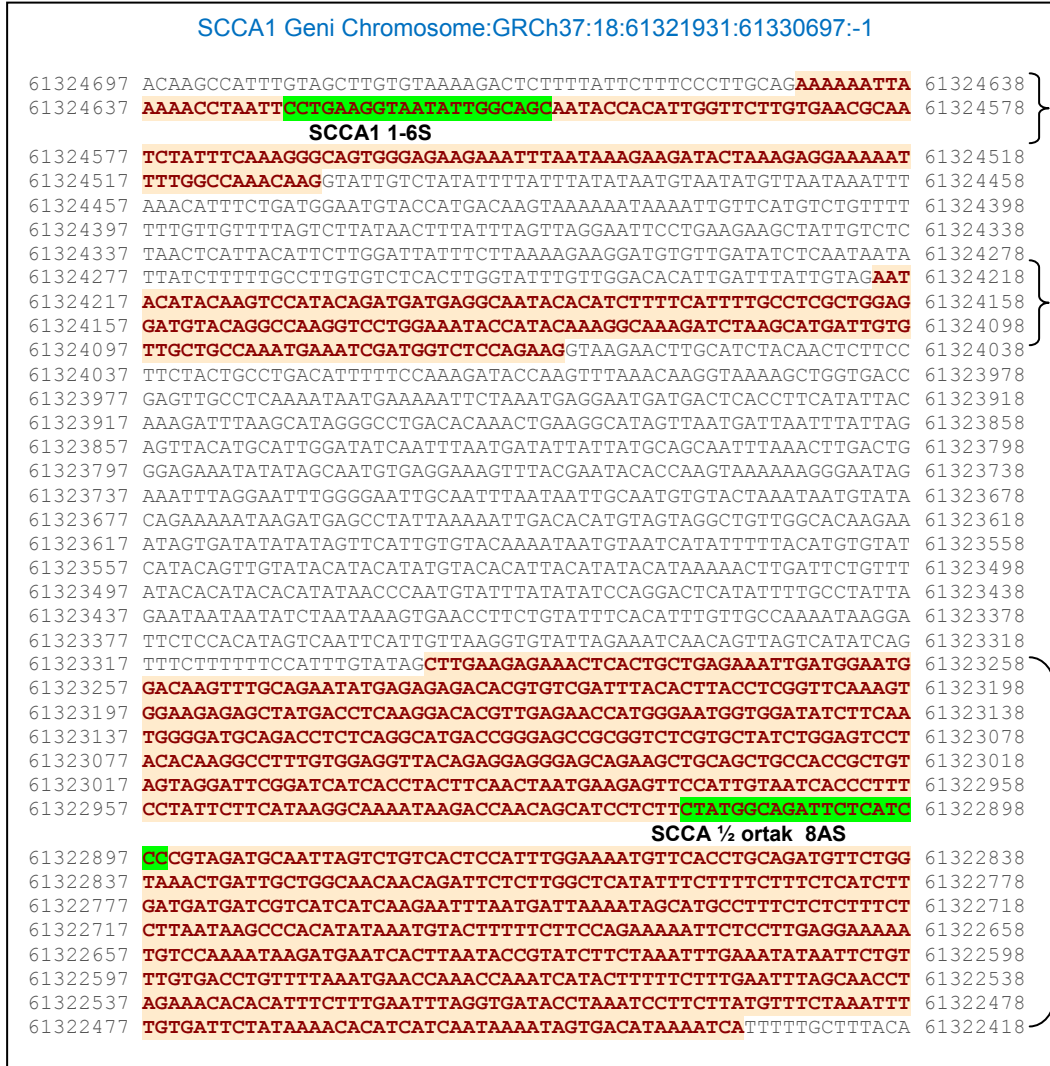
SCCA1 Geni Chromosome:GRCh37:18:61321931:61330697:-1

61324697	ACAAGCCATTTGTAGCTTGTGTAAAAGACTCTTTTATTCTTTCCCTTGCAGAAAAATTA	61324638	}	Ekzon 6		
61324637	AAAACCTAATTCTGAAGGTAATATTGGCAGCAATACCACATTGGTTCTTGTGAACGCAA	61324578				
SCCA1 1-6S						
61324577	TCTATTTCAAAGGGCAGTGGGAGAAGAAATTTAATAAAGAAGATACTAAAGAGGAAAAAT	61324518	}	Ekzon 6		
61324517	TTTGGCCAAACAAGGTATTGTCTATATTTTATTTATATAATGTAATATGTTAATAAATTT	61324458				
61324457	AAACATTTCTGATGGAATGTACCATGACAAGTAAAAAATAAAATTTGTTTCATGTCTGTTTT	61324398	}	Ekzon 7		
61324397	TTTGTGTTTTAGTCTTATAACTTTATTTAGTTAGGAATTCCTGAAGAAGCTATTGTCTC	61324338				
61324337	TAACTCATTACATTCTTGGATTATTTCTTAAAGAAGGATGTGTTGATATCTCAATAATA	61324278				
61324277	TTATCTTTTTGCCTTGTGTCTCACTTGGTATTTGTTGGACACATTGATTTATTGTAGAAAT	61324218				
61324217	ACATACAAGTCCATACAGATGATGAGGCAATACACATCTTTTCATTTTGCCTCGCTGGAG	61324158				
61324157	GATGTACAGGCCAAGGTCTGGAAATACCATACAAAGGCCAAAGATCTAAGCATGATTGTG	61324098				
61324097	TTGCTGCCAAATGAAATCGATGGTCTCCAGAAGGTAAGAACTTGCATCTACAACCTTCC	61324038				
61324037	TTCTACTGCCTGCATTTTTTCCAAAGATACCAAGTTTAAACAAGGTAAAAGCTGGTGACC	61323978				
61323977	GAGTTGCCTCAAATAATGAAAAATTCTAAATGAGGAATGATGACTCACCTTCATATTAC	61323918				
61323917	AAAGATTTAAGCATAGGGCCTGACACAAACTGAAGGCATAGTTAATGATTAATTTATTAG	61323858				
61323857	AGTTACATGCATTGGATATCAATTTAATGATATTATTATGCAGCAATTTAAACTTGGACTG	61323798				
61323797	GGAGAAATATATAGCAATGTGAGGAAAGTTTACGAATACACCAAGTAAAAAAGGGAATAG	61323738				
61323737	AAATTTAGGAATTTGGGGAATTGCAATTTAATAATTGCAATGTGTACTAAATAATGTATA	61323678				
61323677	CAGAAAAATAAGATGAGCCTATTAATAAATTGACACATGTAGTAGGCTGTTGGCACAAGAA	61323618				
61323617	ATAGTGATATATATAGTTTATTGTGTACAAAATAATGTAATCATATTTTTTACATGTGTAT	61323558				
61323557	CATACAGTTGTATACATACATATGTACACATTACATATACATAAAAACTTGATTCTGTTT	61323498				
61323497	ATACACATACACATATAACCCAATGTATTTATATATCCAGGACTCATATTTTGCCTATTA	61323438				
61323437	GAATAATAATATCTAATAAAGTGAACCTTCTGTATTTACATTTGTTGCCAAAATAAGGA	61323378				
61323377	TTCTCCACATAGTCAATTCATTGTTAAGGTGTATTAGAAATCAACAGTTAGTCATATCAG	61323318				
61323317	TTTCTTTTTTCCATTTGTATAGCTTGAAGAGAACTCACTGCTGAGAAATTGATGGAATG	61323258	}	Ekzon 8		
61323257	GACAAGTTTGCAGAATATGAGAGAGACACGTGTGATTTACACTTACCTCGGTTCAAAGT	61323198				
61323197	GGAAGAGAGCTATGACCTCAAGGACACGTTGAGAACCATGGGAATGGTGGATATCTTCAA	61323138				
61323137	TGGGGATGCAGACCTCTCAGGCATGACCGGGAGCCGCGGTCTCGTGCTATCTGGAGTCTT	61323078				
61323077	ACACAAGGCCTTTGTGGAGGTTACAGAGGAGGAGCAGAAGCTGCAGCTGCCACCGTGT	61323018				
61323017	AGTAGGATTCGGATCATCACCTACTTCAACTAATGAAGAGTTCCATTGTAATCACCTTT	61322958				
61322957	CCTATTTCTCATAAGGCCAAAATAAGACCAACAGCATCCTCTTCTATGGCAGATTCTCATC	61322898				
SCCA ½ ortak 8AS						
61322897	CCCGTAGATGCAATTAGTCTGTCACTCCATTTGGAAAATGTTTCACCTGCAGATGTTCTGG	61322838				
61322837	TAAACTGATTGCTGGCAACAACAGATTCTCTTGGCTCATATTTCTTTTCTTTCTCATCTT	61322778				
61322777	GATGATGATCGTCATCATCAAGAATTTAATGATTAAAATAGCATGCCTTTCTCTTTTCT	61322718				
61322717	CTTAATAAGCCACATATAAATGTACTTTTTCTTCCAGAAAAATTCTCCTTGAGGAAAAA	61322658				
61322657	TGTCCAAAATAAGATGAATCACTTAATACCGTATCTTCTAAATTTGAAATATAATTCTGT	61322598				

Şekil 4.14. SCCA1 geni 6,7 ve 8. ekzon bölgeleri ve RT-PZR'de kullanılan ileri ve ters primerler şekil üzerinde gösterilmiştir. Kırmızı ile betimlenmiş diziler ekzon bölgelerini göstermektedir. Yeşil ile betimlenmiş bölgeler primer çiftlerini, renksiz olan DNA dizileri ekzon bölgelerinin arasında kalan intron bölgelerini göstermektedir.

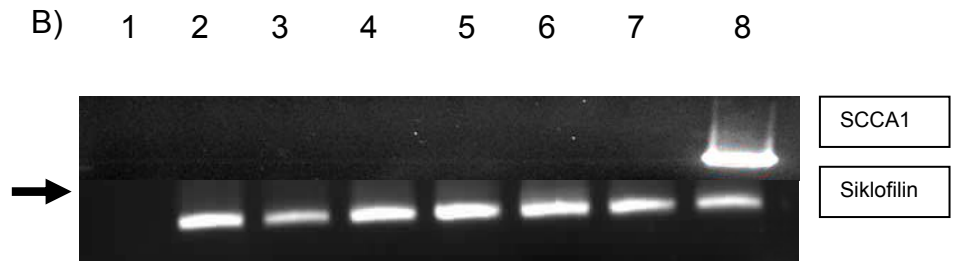
Hem uyarılmamış hem de IL-4 ve IL-13 ile uyarılmış eozinofillerde uyarılmış eozinofillerde SCCA1 ifadesi saptanmadı. Pozitif kontrol olarak SCCA1 vektörü ile transfekte edilmiş ve IL-4 ve IL-13 ile uyarılmış A549 hücreleri kullanıldı (Şekil 4.15).

A)



Ekzon 6

Ekzon 7

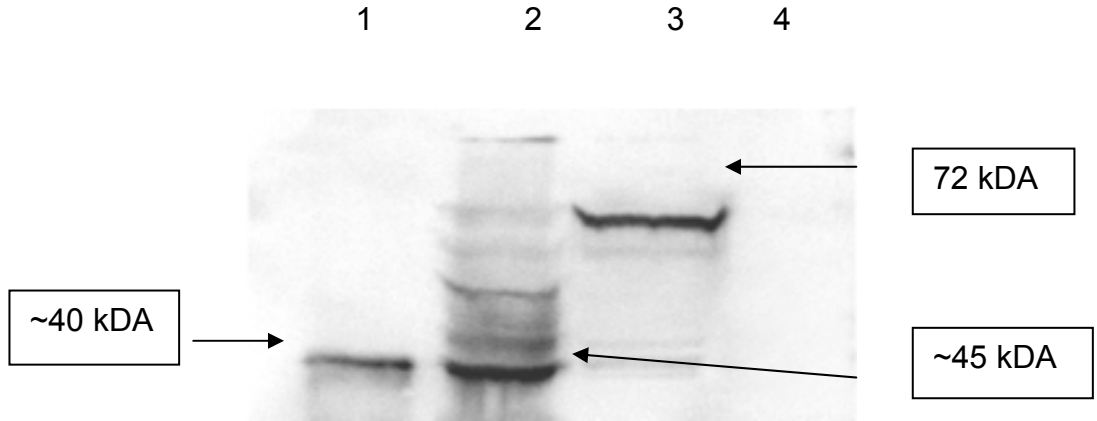


Ekzon 8

Şekil 4.15. SCCA1 geni ekzon 6,7 ve 8 bölgeleri kırmızı kullanılan ileri ve ters primerler yeşil ile betimlenmiştir (A). Eozinofil kültürlerinde SCCA1 RT-PCR sonucu, boş su örneği (1), uyarılmamış eozinofil kültürü (2) IL4+IL13 ile uyarılmış eozinofil kültürü (3), IL5 ile uyarılmış eozinofil kültürü (4), IL4+IL5 ile uyarılmış eozinofil kültürü (5), IL13+IL5 ile uyarılmış eozinofil kültürü (6), IL4+IL13+IL5 ile uyarılmış eozinofil kültürü (7) ve SCCA1 ile transfekte edilmiş ve IL4+IL13 ile uyarılmış A549 hücreleri (8), (B)

4.7. SCCA1 pcDNA Ekspresyon Vektörü ile Transfekte Edilmiş A549 Hücre Lizatlarının Western Blot Sonucu

SCCA1 ifade vektörü ile transfekte edilmiş A549 hücrelerinde SCCA1 proteinin sentezlendiği Western blot yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır (Şekil 4.16). İzole edilen SCCA1 proteinin, rekombinant protein ve serviks kanserinden elde edilen doğal proteine göre daha ağır olmasının sebebi, transfeksiyonda kullanılan vektörün SCCA1 genine ilave olarak Glutatyon S transferaz genini içermesidir. Transfeksiyonda kullanılan vektör Harvard Üniversitesi Brigham and Women's Hospital'dan Dr. Şule Çataltepe tarafından temin edilmiştir.

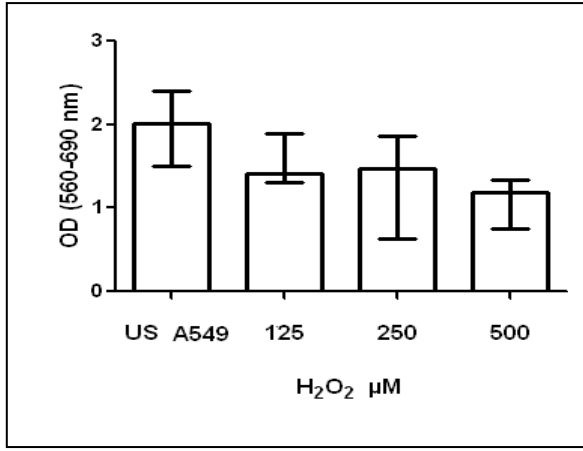


Şekil 4.16. İnsana karşı farede üretilen monoklonal antikorunu kullanılarak SCCA1 proteinin Western Blot tekniğiyle gösterilmesi: Rekombinant SCCA1 proteini (1), serviks kanser doku örneği (2) ve GST-SCCA1 vektörü ile transfekte edilmiş A549 hücrelerinden elde edilen protein (3), A549 hücresi (4).

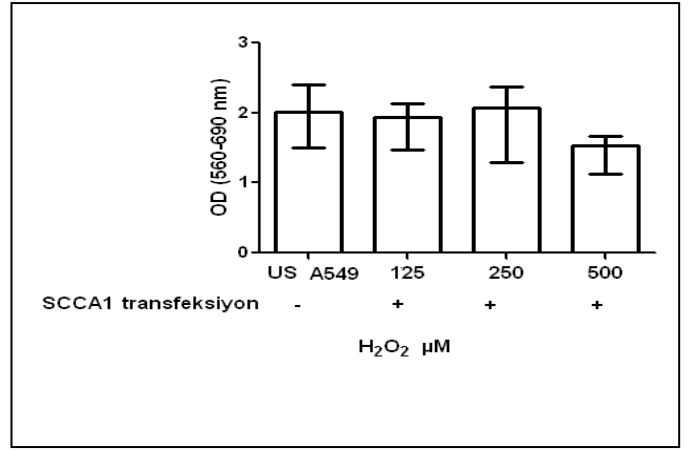
4.8. SCCA1'in, Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Tarafından indüklenen Hücre Ölümü (Olası Apoptoz) Üzerine Etkisi

Artan H₂O₂ koşullarında SCCA1 ifade vektörü ile transfekte edilmiş A549 hücrelerinde hücre canlılığının transfekte edilmemiş hücelere göre daha yüksek olduğu; diğer bir ifadeyle SCCA1'in hücreleri hücre ölümüne (olası apoptoza) karşı koruduğu hem MTT hem de Anneksin V/PI boyama yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil 4.17 A-D).

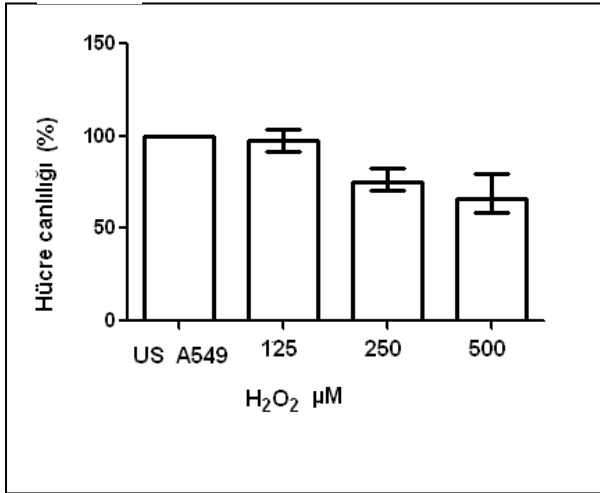
A)



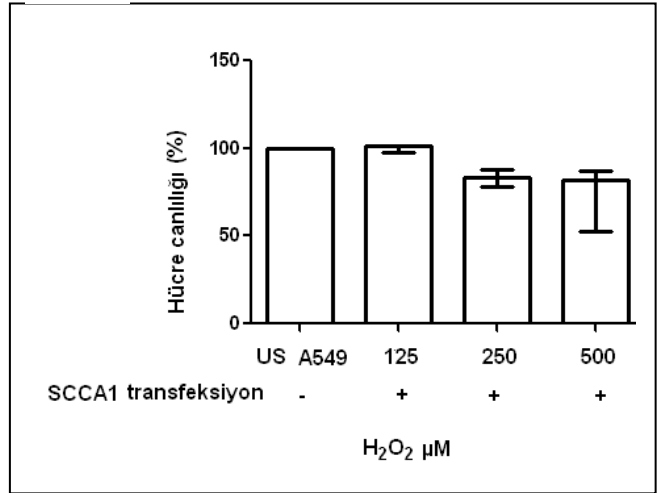
B)



C)



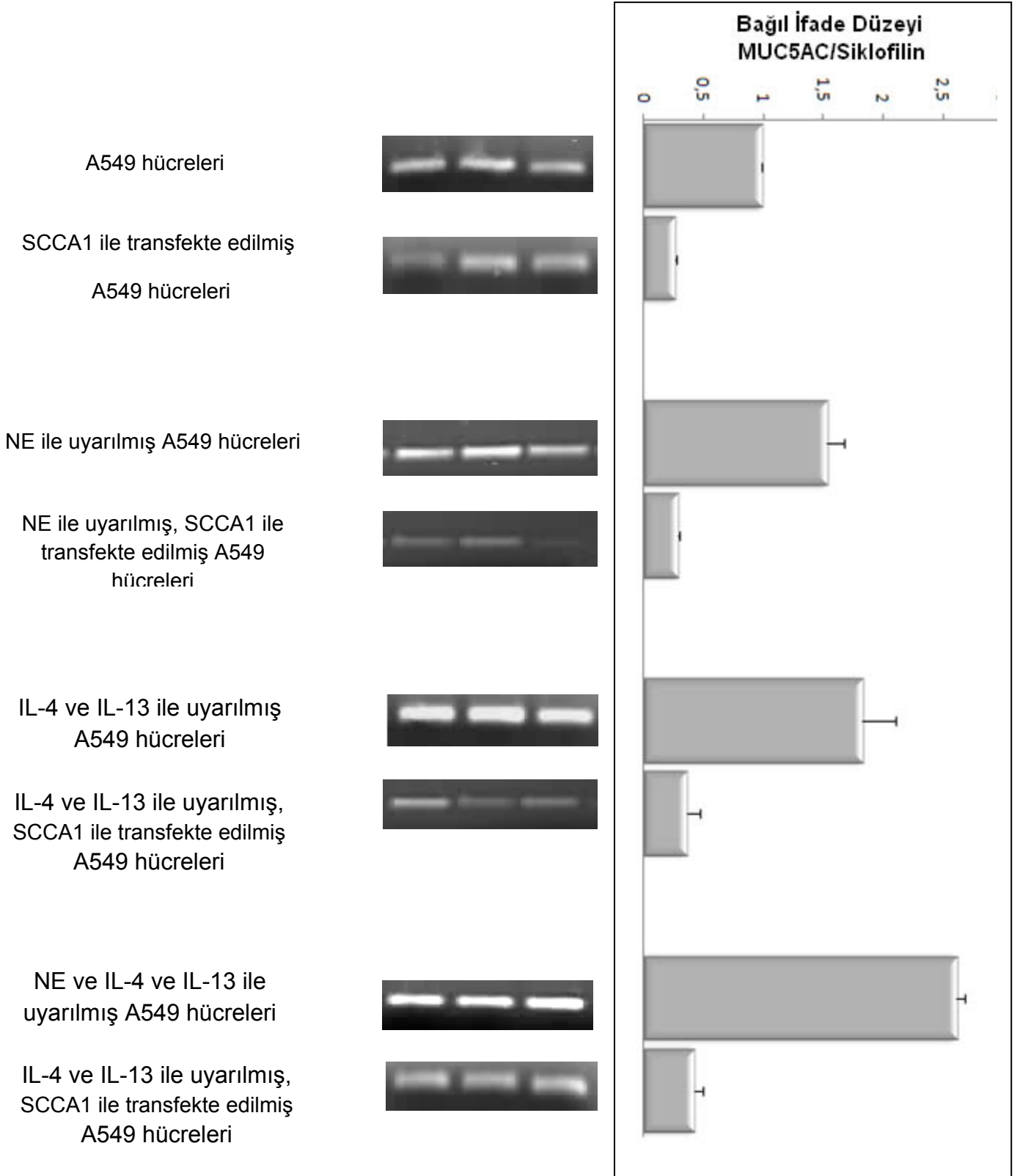
D)



Şekil 4.17. SCCA1 proteininin hücre ölümü (apoptoz) üzerine olan etkisi A) Artan H₂O₂ koşullarında A549 hücrelerinde MTT yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi B) SCCA1 ile transfekte A549 hücrelerinde artan H₂O₂ koşullarında SCCA1'in hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi C) Artan H₂O₂ koşullarında A549 hücrelerinde Anneksin V/PI yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi D) SCCA1 ile transfekte A549 hücrelerinde artan H₂O₂ koşullarında SCCA1'in hücre canlılığı üzerine etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile gösterilmesi (Tek yönlü ANOVA, p<0,05)

4.9. Nötrofil Elastaz ile Muamele Edilmiş Alveolar Epitel Hücre Kültüründe SCCA1' in MUC5AC İfadesi Üzerine Etkisi

RT-PZR sonucunda transfeksiyon ile ortaya çıkarılan ve IL-4 ve IL-13 ile artırılan SCCA1 ifadesinin, hem bazal düzeyde oluşan hem de nötrofil elastaz tarafından uyarılan MUC5AC üretimini önemli ölçüde azalttığı transkripsiyonel düzeyde gösterilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. SCCA1'in A549 hücrelerinde, uyarılmamış, NE ile uyarılmış ve IL-4, IL-13 ile uyarılmış koşullarda Muc5AC geni ifadesi üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA

Astım hava yollarının aşırı duyarlılığı ve daralması ile karakterize edilen kronik bir solunum sistemi hastalığıdır. Astım hastalığının daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikli olarak astımlı bir hastada hava yollarında meydana gelen patolojik olayların bilinmesi gereklidir. İnflamatuvar hücrelerin görev aldığı inflamasyon, epitel hücre hasarı ve hava yolu daralmasına yol açan aşırı mukus üretimi astım hastalarında gözlenen genel patolojik bulgulardır. Astım hastalığının, bireyin genetik yapısı ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu meydana geldiği düşünülmektedir.

İmmünolojik olarak astımda Th2 hücrelerinin aktif olduğu ve bu hücrelerden salınan IL-4 ve IL-13'ün astım patolojisinde önemli görevler üstlendiği bilinmektedir. Yakın zamanda, bronş epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada IL-4 ve IL-13 ile uyarılan hücrelerde, Skuamoz Hücre Karsinoma Antijenlerinin (SCCA1 ve SCCA2) ifadesinin yaklaşık 20 kat arttığı bildirilmiştir (Yuyama et al., 2002).

SCCA1 ve SCCA2 proteinleri, kan pıhtılaşması, fibrinlerin parçalanması, anjiogenez, apoptoz, mikrobiyal enfeksiyon ve inflamasyon gibi birçok biyolojik olayda rol oynayan serpin protein ailesinin üyeleridir (Van Gent et al.,2003). İlk defa Serviks Skuamoz Kanser hücrelerinden izole edilen bu proteinlerin tümör hücrelerinde apoptoz ve NK hücre göçünü engellediğine dair bulgular bulunmaktadır (Suminami et al., 2001).

SCCA1 ve SCCA2 proteinlerinin astım patolojisi ile ilgili olabileceğine dair çalışmalar bulunmasına karşın eldeki bilgiler son derece sınırlı ve mekanizmayı açıklamak için yetersizdir. Bu tez çalışmasının amacı, SCCA proteinlerinin astımdaki fizyolojik yerini tanımlamak ve henüz tam olarak anlaşılammış olan astım patogenezinin açıklanmasına katkıda bulunmaktır.

Bu çalışmada SCCA1 ve SCCA2 genlerinin astımla ilişkili genetik varyantlarını belirlemek amacıyla SCCA1 ve SCCA2 genlerine ait promotor, 5' UTR ve ekzon 1 bölgelerinin DNA dizi analizi yapılmıştır.

DNA dizi analizi sonucunda, SCCA1 geninin promotor bölgesinde dört adet tek nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bu dört polimorfizmin %10'dan daha yüksek

sıklıkta bulunduğu ve birlikte kalıtıldığı belirlenmiştir. Bulunan polimorfizmler promotor bölgede genin transkripsiyon başlama noktasına olan uzaklığına göre uzak promotordan yakın promotor bölgesine doğru Pol 1, Pol 2, Pol 3 ve Pol 4 şeklinde numaralandırılarak gösterilmiştir ve bu polimorfizmlerin motif yapıları Pol 1- GAA[A/G]ATG, Pol 2-CCT[A/G]ATA, Pol 3- CAT[T/C]GGA, Pol 4- GAG[A/G]CTT şeklindedir.

SCCA2 geninin promotor bölgesinin DNA dizi analizi sonucunda; sıklığı %10'un üzerinde olduğu saptanan bir adet tek nükleotit polimorfizmi gösterilmiştir. Promotor bölgenin transkripsiyon başlama noktasına olan uzaklığına bağlı olarak göreceli olarak daha yakın promotor bölgede Pol 5 olarak adlandırılan bu polimorfizm TTG[G/T]TTT motifine sahiptir.

Ayrıca SCCA1 geninin translasyona uğramayan 1. ekzonunda bir astımlı hastada tek nükleotit polimorfizmi (Pol 6- GAG[G/A]GAG) bulunmuştur. Önemli bir nokta olarak; Ensembl'da (www.ensembl.org) Ekzon 1 olarak adlandırılan bu bölge Hamada ve arkadaşlarının çalışmasında promotor bölgesi olarak belirtilmektedir (Hamada et al., 2001).

SCCA1 ve SCCA2 genlerinin gösterdikleri yüksek homoloji (nükleotit düzeyinde % 92) nedeniyle bu çalışmada , PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler her iki genin birbirinden farklılık gösterdiği bölgeler göz önüne alınarak seçilmiştir. Dizi analiz sonuçlarının SCCA1 ya da SCCA2 genine özgül olup olmadığı bu iki gen arasındaki farklı nükleotit dizilerinin karşılaştırılması ile kontrol edilmiştir. SCCA1 geninin promotor bölgesinde yer alan Pol 1, Pol 3 ve Pol 4 polimorfizmlerinin varlığı ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

SCCA1 ve SCCA2 geni promotor bölgesinde yer alan polimorfizmlerin frekansları incelendiğinde; SCCA1 geninin promotor bölgesinde yer alan birbirine bağlı dört polimorfizmin görülme sıklığı astımlı ve sağlıklı bireyler arasında farklı bulunmamıştır. Ancak astımlı bireyler kendi içerisinde atopik ve atopik olmayan şeklinde ayrıldığında atopik astımlı bireylerde atopik olmayan astımlı bireylere göre daha yüksek sıklıkta homozigot polimorfizmin varlığı saptanmıştır. SCCA2 geninin promotor bölgesinin genotipleme sonucunda ise sağlıklı, atopik astımlı ve atopik olmayan astımlı bireylerde polimorfizm görülme sıklıkları arasında fark bulunamamıştır.

Astımda etkili inflamatuvar hücrelerden eozinofillerde SCCA1 protein ifadesi uyarılmamış ve sitokinlerle uyarılmış düzeylerde incelenmiş ancak SCCA1 protein ifadesi eozinofillerde bulunamamıştır. SCCA1 proteininin hücredeki biyolojik görevlerini ortaya koymak amacıyla hücre ölümü (apoptoz) üzerine etkisi araştırılmış ve pcDNA SCCA1 ifade vektörü ile transfekte edilmiş A549 hücrelerinde oksidan bir uyarıcı olan hidrojen peroksit ile uyarılmış hücre ölümü (olası apoptoz) üzerine SCCA1 proteininin koruyucu etkisine dair bulgular elde edilmiştir. Diğer yandan astım patolojisinde önemli yeri olan musin salınımı üzerine SCCA1 proteininin etkisi A549 hücre kültür sisteminde incelenmiş ve SCCA1 proteininin MUC5AC geninin ifadesini transkripsiyon düzeyinde baskılayıcı etkisi olduğu saptanmıştır.

SCCA1 geninin promotor bölgesinde bulunan dört nükleotit değişikliği astımlı ve sağlıklı bireylerde PZR-RFLP tekniği kullanarak genotiplendirildiğinde iki grup arasında bir fark bulunamamasına karşın; astımlı grup kendi içerisinde atopik ve atopik olmayan şeklinde ayrıldığında atopik grupta homozigot polimorfizm taşıma sıklığının daha yüksek oranda olduğu görülmüştür ($p=0,038$). Astımlı ve sağlıklı bireylerden elde edilen genotiplendirme sonuçları tek başına değerlendirildiğinde hastalık-genetik varyant ilişkilendirilmesinin yapılamayacağı görülmektedir. Ancak astım hastaları kendi içerisinde gruplandırıldığında atopik bireylerde belirtilen homozigot polimorfizmlerin varlıkları bakımından hastalık-genetik varyant ilişkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu ilişkinin yalnızca genetik ve çevresel riskler nedeniyle sadece astımlı atopik bireyler için mi geçerli olduğu, yoksa sağlıklı (atopik sağlıklı, atopik olmayan sağlıklı) bireyler içinde geçerli olup olmadığı ortaya konulamamıştır. Sağlıklı bireyler içerisinde yer alan atopik grup ve atopiye sahip olmayan grubun bu polimorfizmler için değerlendirilmeleri gereklidir. Nishi ve arkadaşları çalışmalarında akut astımlı ve sağlıklı çocukların serumlarında SCCA protein seviyelerini karşılaştırmış, sağlıklı ve astımlı bireyler arasında bir fark tespit edememişlerdir. Ancak, hastalığın akut ve iyileşme döneminde astımlı çocukların serumlarındaki SCCA protein düzeyleri ölçüldüğünde iyileşme dönemindeki protein düzeyinin anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. SCCA proteinlerinin astımın şiddeti ile ilişkili olabileceği bu çalışmada gösterilmesine karşın çalışma grubunda yer alan astımlı bireylerin atopi yönünden bilgileri bulunmamaktadır (Nishi et al., 2005). SCCA proteinlerinin atopi

ile ilişkilendirildiği Mitsuishi ve arkadaşlarının çalışmasında; serum SCCA düzeyi Th2 tip inflamasyon ve AD hastalarının klinik şiddetleri ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu çalışma grubunda da AD'li hastalar astım yönünden araştırılmamıştır (Mitsuishi et al., 2005). Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, SCCA protein düzeyleri atopi ve astım ile ayrı ayrı ilişkilendirilmesine karşın astımlı hastalarda atopinin SCCA düzeyi ile olan ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanamamıştır. İlk defa bu çalışmada, astım ile ilişkili olabilecek genetik varyasyonlar tanımlanmış ve bunun atopik astımla ilişkili olabileceği öngörülmüştür.

Bu çalışmada SCCA1 genine ait promotor bölgede saptanan polimorfizmler göreceli olarak uzak promotor dizisi içerisinde yer almaktadır. Literatürden elde edilen veriler, genellikle gen yapılarına ait promotor dizilerinin 5' UTR bölgesinden itibaren uzak promotor bölgesine doğru ortalama 500 bazlık kısmın transkripsiyon aktivitesini etkileme açısından daha aktif konsensus diziler içerdiğini göstermesine karşın bu yapılanmanın bir genden diğerine değişkenlik gösterdiği de bilinmektedir.

Promotorlar, transkripsiyon işlemi için tanıma noktası olarak görev yapan dizilerdir ve transkripsiyonun bazal seviyede başlaması için gerekli bölgeyi temsil ederler. Ökaryotik genlerin promotor dizileri genellikle yüzlerce nükleotit uzunluğundadır ve yerleşimi, organizasyonu değişebilen birimlerdir. Promotor dizilerindeki mutasyonlar gen ifadesinin başlamasına ve etkinliğini azaltmaya ya da yükseltmeye neden olabilir. Genler, promotor elementlerinin çeşidi, sayısı, yerleşimi açısından farklıdır. Diğer yandan silensör ya da enhansör (sessizleştirici ya da artırıcı) olarak adlandırılan DNA dizileride genlerin transkripsiyonlarının kontrolünde en az promotor dizileri kadar önemlidir.

Bu çalışmada SCCA1 geninin promotor bölgesine ait yaklaşık 1000 bazlık nükleotit dizisinin analizi gerçekleştirilmiştir. Literatürde bu gene ait promotor dizilerinin hangi konsensus dizilerini içerdiği ve bunların yerleşimlerinin nerelerde olduğuna dair bulgular son derece yetersizdir. Bu çalışmada saptanan polimorfizmler herhangi bir genin promotor bölgesinde genellikle rastlanabilen TATA, CAAT ve GC kutuları gibi çok önemli cis-akting (cis- acting) elementlerin yer alabildiği proksimal promotor bölgeye göre göreceli olarak distal uçta yer almaktadır. Bu açıdan bakıldığında saptanan polimorfik değişimlerin herhangi bir

konsensus dizinin bir elementinin olup olmadığı ya da SCCA1 genine özgü ve transkripsiyonu etkileyen fakat yerleşim olarak distal yapılanma gösteren trans-acting (trans-acting) elementlerin bağlanma dizilerinin içerisinde yer alıp almadıkları araştırma konusu olmalıdır.

SCCA2 geninin promotor bölgesinde bulunan Pol 5 olarak adlandırılan ve TTG[G/T]TTT) motifine sahip tek nükleotit değişikliği, PZR-RFLP yöntemi kullanılarak astımlı ve sağlıklı bireylerde araştırılmış ve genotip sıklıkları arasında bir fark bulunamamıştır. Astımlı grup kendi içerisinde atopik ve atopik olmayan şeklinde ayrıldığında da bu iki grubun polimorfizmi taşıma sıklıkları arasında bir fark bulunamamıştır. SCCA2 promotor bölgesinde bulunan Pol 5 tek nükleotit değişikliğinin promotor aktivitesi üzerine etkisi in-vitro hücre kültür koşullarında Suminami ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Suminami et al.,2005). Suminami ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada G/T tek nükleotit değişikliğinin yeri promotor bölgede -337. pozisyon olarak gösterilmiştir. Normal ve homozigot değişikliği taşıyan lüsiferaz vektörlerinin promotor aktivitelerinin karşılaştırılması sonucunda, homozigot polimorfizm taşıyan lüsiferaz vektör klonlarında aktivitenin normale göre düşük olduğunu bulunmuştur. Promotor aktiviteleri arasında gözlenen farkın transkripsiyon bağlanma faktörlerinden kaynaklanabileceğini ve tek nükleotit değişikliğinin bulunduğu bölgenin transkripsiyon faktörlerinden CCAAT/enhansır bağlama proteini için konsensus bağlanma dizisi içerdiği gösterilmiştir. Promotor aktivitesinde görülen azalmanın, tek nükleotit değişikliği nedeniyle CCAAT ya da başka bir transkripsiyon faktörünün bağlanma etkiniliğinin azalması sonucunda olabileceği öngörülmüştür (Suminami et al.,2005).

Atopik astımlı, atopik olmayan astımlı ve sağlıklı bireylerin SCCA2 genotip sıklıkları arasında bir fark bulunamadığından astımla ilişkili hücrel mekanizmaların açıklanmasına yönelik çalışmalar SCCA1 proteini ile devam edilmiştir.

SCCA1 proteinin insan Skuamoz Hücre Kanserlerinde (SCC) yüksek miktarda arttığı; anti-kanser ilaçları ve TNF- α ile indüklenen apoptozu baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 üzerinden gerçekleştiği öngörülmektedir (Suminami et al., 2000). Radyasyon uygulaması sonucunda

indüklenen apoptoz üzerinde de SCCA1 proteinin baskılayıcı etkisi gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada keratinosit hücrelerinde UV ile indüklenen apoptozu SCCA1 proteininin c-JunNH₂ – terminal kinaz-1 (JNK1) baskılanması yoluyla engellendiği bulunmuştur (Katagiri et al., 2006). Bu tez çalışmasında, SCCA1 proteininin A549 hücrelerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) ile indüklenen hücre ölümüne (olası apoptoza) karşı koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur. Astımlı bireylerin akciğer epitel hücrelerinde hücre ölümünün baskılanması sonucu artan hücre ömrü, bu hücreler tarafından salınan sitokin ve kemokinlerin daha uzun süreyle salınmalarına yol açabilecek ve böylelikle patolojinin şiddeti ve devamlılığı etkilenebilecektir. SCCA1 proteinin akciğer epitel hücrelerinde hücre ölümü üzerine olan etkisi gösterilmesine karşın bu etkinin hangi yol üzerinden gerçekleştiğine dair elimizde kesin bir sonuç bulunmamaktadır.

Akciğer patolojisinde önemli bir diğer faktör de mukus üretimidir. Sağlıklı bireylerde mukus epitel hücrelerinin üzerini kaplamakta ve epitel hücrelerini dış etkilere karşı korumaktadır. Ancak astım hastalarında mukus üretimindeki dengenin bozulması sonucunda artan mukus üretimi hava yolunda daralmaya ve akciğer fonksiyonlarında bozulmaya yol açmaktadır (Rogers et al., 2007). Nötrofiller kronik bronşit, kistik fibroz ve astımında dahil edilebileceği birçok inflamatuvar akciğer hastalığında yer almaktadır. Nötrofiller salgıladıkları çeşitli aracı (mediatör) moleküllerle astım patolojisinde rol almaktadırlar. Nötrofillerin salgıladıkları nötrofil elastaz (NE), Katepsin G gibi proteazlar mukus üretimi üzerine artırıcı bir etkiye sahiptir (Park et.al 2005). Hava yollarında salgılanan mukus, lipidlerin, glukokonjugantların ve proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Sağlıklı bir kişide mukusun %2'lik kısmını musin (MUC) proteinleri oluşturmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış 17 musin geni vardır ve bunların içerisinde MUC5AC yüzey epitelindeki goblet hücrelerinde yüksek miktarda ifade olmaktadır (Thornton et al., 2008). Bir serin proteaz olan nötrofil elastazın A549 akciğer epitel hücrelerinde MUC5AC ifadesi ve salınımını transkripsiyonal ve protein düzeyinde artırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Voynow et al., 1999; Fisher and Voynow, 2000). Serin proteaz inhibitörü olan SCCA1 proteinin akciğerdeki mukus üretimi üzerine olan etkisi ile ilgili bir çalışma literatür bilgilerinde bulunamamıştır. Bu tez çalışması kapsamında SCCA1'in akciğerde ifade olan musinlerin en önemlilerinden MUC5AC proteini üzerine olan etkisi transkripsiyonel düzeyde

incelenmiş; bazal ve nötrofil elastaz ile uyarılmış düzeydeki MUC5AC üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Musin ifadesini artırdığı gösterilmiş olan IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin (Dabbagh et al., 1999; Thai et al., 2005) varlığında nötrofil elastazlı ve nötrofil elastazsız koşullarda SCCA1 proteinin etkisine bakılmış ve MUC5AC transkripsiyonunun azaldığı bulunmuştur. Ancak hem bazal düzeyde hem de uyarılmış düzeyde MUC5AC ifadesinde gözlenen azalmanın SCCA1'in proteaz inhibisyon mekanizması yoluyla mı yoksa farklı bir mekanizma yoluyla mı gerçekleştiğini söyleyebilecek veriler elimizde bulunmamaktadır. Ancak özellikle epitel hücrelerinde doğal olarak koruyucu bir rolü olan, astımlı bireylerde ise patolojiyi şiddetlendirici özelliği bulunan mukus üretim fizyolojisi üzerinde SCCA1 proteinin yerinin ortaya çıkartılması son derece önemli olacaktır.

Tez çalışması kapsamında diğer bir çalışmada, astım patolojisinde önemli bir yeri olan eozinofillerde SCCA1 geninin araştırılmıştır. SCCA1 geninin ifadesi uyarılmamış ve sitokinlerle (IL-4, IL-5 ve IL-13) uyarılmış düzeyde eozinofil hücrelerinde transkripsiyonel düzeyde incelenmiş ve kullanılan hücre kültürü koşullarında SCCA1 ifadesi saptanamamıştır. Buna karşın inflamasyonla birlikte serumda SCCA1 düzeyindeki artışa neden olabilecek diğer inflamatuvar hücrelerdeki SCCA1 varlığı bu tez kapsamında incelenmemiştir. Mast hücreleri, nötrofiller gibi astım patolojisinde önemli yere sahip hücrelerde SCCA1 geninin ifadesinin araştırılması inflamasyonda artan SCCA1 seviyesini açıklamada yardımcı olabilecektir.

Elde ettiğimiz veriler göstermektedir ki SCCA1 proteini farklı metabolik yollar üzerinde etkili olmaktadır. SCCA1 proteinin oynadığı rolü yalnızca proteazların inhibisyonu ile açıklamak oldukça zor görünmektedir. Keratinosit hücrelerinde JUNK1 proteinine bağlanarak apoptozu engellediğini gösteren yayınlar SCCA1 proteinin proteaz inhibitör mekanizması dışında da işlevsel role sahip olduğu öngörüsünü desteklemektedir. Astım patolojisinde farklı hücresel yollar üzerine olan olası etkileri düşünüldüğünde; SCCA1 proteininin astımda daha iyi çalışılması ve anlaşılması gereken yeni bir oyuncu olduğu fikrini doğurmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai S., 2007a, Cellular and Molecular Immunology, 283-284.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai S., 2007b, Cellular and Molecular Immunology, 293-294 p.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai S., 2007c, Cellular and Molecular Immunology, 491 p.
- Akimoto, T., Numata, F., Tamura, M., Takata, Y., Higashida, N., Takashi, T., Takeda, K., Akira, S., 1998, Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice, J. Exp. Med., 187, 1537-42.
- American Lung Association web sitesi, <http://www.lungusa.org/>
- Andree, H.A.M., Reutelingsperger, C.P.M., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M., 1990, Binding of vascular anticoagulant c~ (VACc~) to planar phospholipid bilayers, J. Biol. Chem., 265:4923-4928.
- Arnaldo, C., 2008, Pediatric Allergy, Asthma and Immunology, Springer Press, 732p.
- Asokanathan, N., Graham, P.T., Stewart, D.J., Bakker, A.J., Eidne, K.A., Thompson, P.J., Stewart, G.A., 2002, House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1, J. Immunol., 169:4572-8.
- Beuther, D.A., Weiss S.T., Sutherland, E.R., 2006, Obesity and asthma. Am J Respir. Crit. Care. Med. , Jul 15;174(2):112-9. Epub 2006 Apr 20.
- Bochner, B. S., Undem, B. J., & Lichtenstein, L. M. ,1994, Immunological aspects of allergic asthma. Annu Rev Immunol, 12: 295–335.
- Bolli J.A., Doering D.L., Bosscher J.R., Day T.G. Jr, Rao C.V., Owens K., Kelly B., Goldsmith J., 1994, Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, Gynecol Oncol., Nov;55(2):169-73.

- Calhoun, W.J., Murphy, K., Stevens, C.A., Jarjour, N.N., Busse, W.W., 1992, Increased interferon- γ and tumor necrosis factor- α in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid after antigen challenge in allergic subjects, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: A638 .
- Campbell B., De'Ambrosio B., 1990, Squamous cell carcinoma antigen in patients with cutaneous disorders, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 22:639-42.
- Cataltepe, S., Gornstein, E.R., Schick, C., Kamachi, Y., Chatson, K., Fries, J., Silverman, G.A., Upton, M.P., 2000, Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas, *J. Histochem. Cytochem.*, 48:113-22.
- Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A., Paul, W.E., 1986, B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells, *J. Immunol.*, 136:4538-4541.
- Corrigan, C.J, Kay, A.B., 1990, CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma: relationship to disease severity and atopic status, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141:970-7.
- Çelik, G.E. , 2004, Astım epidemiyolojisi ve risk faktörleri. Astım Tanı ve Tedavi. Güncel Akciğer Hastalıkları Serisi: 10. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 9-37.
- Dabbagh, K., Takeyama, K., Lee, H.M., Ueki, I.F., Lausier, J.A., Nadel, J.A., 1999, IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo, *J Immunol.*, May 15;162(10):6233-7.
- Duk, J.M., de Bruijn, H.W., Groenier, K.H., Hollema, H., ten Hoor, K.A., Krans M., Aalders J.G., 1990, Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations, *Gynecol Oncol.* Nov;39(2):186-94.
- Enelow, R., Baramki, D.F., Borish L.C., 2004, Inhibition of effector T lymphocytes mediated through antagonism of IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113:560-562.
- Fischer B, Voynow J., 2000, Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest.* May;117(5 Suppl 1):317S-20S.

- Foster, P.S., Webb, D.C., Yang M., Herbert, C., Kumar, R.K., 2003, Dissociation of T helper type 2 cytokine-dependent airway lesions from signal transducer and activator of transcription 6 signalling in experimental chronic asthma, *Clin Exp Allergy*, 33: 688-95.
- GINA, Global Initiative for Asthma, 2002.
- GINA, Global Initiative for Asthma, 2009.
- Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H., Valdimarsson, H., 2004, Immunopathogenic mechanisms in psoriasis, *Clin. Exp. Immunol.*, 135:1–8.
- Hahn, C., Teufel, M., Herz, U., Renz, H., Erb, K.J., Wohlleben, G., Brocker, E.B., Duschl, A., Sebald, W., Grunewald, S.M., 2003, Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111: 1361-9.
- Hamada, K., Shinomiya, H., Asano, Y., Kihana, T., Iwamoto, M., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Hirose, S., Kyo, S., Ito, M., 2001, Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter., *Biochim. Biophys. Acta.*, Mar 19;1518(1-2):124-31.
- Hamid, Q., Tulic, M., 2009, Immunobiology of Asthma, *Annu. Rev. Physiol.*, 71:489–507.
- Hashimoto, K., Kiyoshima, T., Matsuo, K., Ozeki, S., Sakai, H., 2005, Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF-alpha-induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line, *Tumour Biol.*, 26:165–72.
- Horwood, L.J., Fergusson, D.M., Shannon, F.T., 1985, Social and familial factors in the development of early childhood asthma , *Pediatrics.*, May;75(5):859-68.
- <http://motif.genome.jp/>
- <http://www.ensembl.org>
- ISAAC. ,1998, Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), *Eur. Respir. J.*, 12:315–35.

- Jenmalm, M.C., Van Snick J., Cormont, F., Salman, B., 2001, Allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion in relation to specific allergen sensitization and atopic symptoms in children, *Clin. Exp. Allergy*, 31: 1528-35.
- Katagiri, C., Nakanishi, J., Kadoya, K., Hibino, T., 2006, Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase, *J. Cell Biol.*, 172:983–90.
- Kato H., Suehiro, Y., Morioka, H., Torigoe, T., Myoga, A, Sekiguchi K, Ikeda I, 1987, Heterogeneous distribution of acidic TA-4 in cervical squamous cell carcinoma: immunohistochemical demonstration with monoclonal antibodies, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78:1246-50.
- Kato, H., Nagaya, T., Torigoe, T., 1984, Heterogeneity of a tumor antigen TA-4 of squamous cell carcinoma in relation to its appearance in the circulation, *Jpn. J. Cancer*, 75: 433-5.
- Kato, H., Torigoe, T., 1977, Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma, *Cancer*, 40(4):1621-8.
- Kawashima, H., Nishimata, S., Kashiwagi, Y., Numabe, H., Sasamoto, M., Iwatsubo, H., Takekuma, K., Hoshika, A., 2000, Squamous cell carcinoma-related antigen in children with atopic dermatitis, *Pediatr Int*, 42:448-50.
- King C, Brennan S, Thompson PJ, Stewart GA., 1998, Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium, *J. Immunol.*, 161:3645-51.
- Krug, N., Madden, J., Redington, A.E., Lackie, P., Djukanovic, R., Schauer, U., 1996, T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 14:319-26.
- Kumar, A., Ghosh, B., 2009, Genetics of asthma: a molecular biologist perspective, *Clinical and Molecular Allergy*, 7:7:10.1186/1476-7961-7-7.
- Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M., Grusby, M.J., 1998, Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production, *J. Exp. Med.*, 187: 939-48.
- Kuperman, D.A., Huang, X., Koth, L.L., Chang, G.H., Dolganov, G.M., Zhu, Z., Elias, J.A., Sheppard, D., Erle, D.J., 2002, Direct effects of interleukin-13

- on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma, *Nat. Med.*, 8: 885-9.
- London, S.J., Gauderman, W.J., Avol, E., Rappaport, E.B., Peters, J.M., 2001, Family history and the risk of early-onset persistent, early-onset transient, and late-onset asthma, *Epidemiology*, 12:577–83.
- Lordan, J.L., Bucchieri, F., Richter, A., Konstantinidis, A., Holloway, J.W., Thornber, M., Puddicombe, S.M., Buchanan, D., Wilson, S.J., Djukanovic, R., Holgate, S.T., Davies, D.E., 2002, Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells, *J. Immunol.*, 169: 407-14.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Saido, T., Green, D.R., 1995, Proteolysis of Fodrin (nonerythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270:6425-6428.
- Martinez, F.D., Wright, A.L., Taussig, L.M., Holberg, C.J., Halonen, M., Morgan, W.J., 1995, Asthma and wheezing in the first six years of life, The Group Health Medical Associates, *N. Engl. J. Med.*, Jan 19;332(3):133-8.
- Mino, N., Iio A., Hamamoto, K., 1988, Availability of tumor-antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs, *Cancer*, Aug 15;62(4):730-4.
- Mitsuishi, K., Nakamura, T., Sakata, Y., Yuyama, N., Arima, K., Sugita, Y., Suto, H., Izuhara, K., Ogawa, H., 2005, The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis, *Clin. Exp. Allergy.*, Oct;35(10):1327-33.
- Moffatt, M.F., Kabisch, M., Liang, L., Dixon, A.L., Strachan, D., Heath, S. et al., 2007, Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma, *Nature*, 448:470-3.
- Molina, R., Filella, X., Torres, M.D., Ballesta, A.M., Mengual, P., Cases, A., Balaque, A., 1990, SCC antigen measured in malignant and nonmalignant diseases, *Clin. Chem.*, 36:251-4.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J. Immunol.*, 136: 2348-57.

- Mould, A.W., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I., Young, I.G., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., 2000, The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J. Immunol.*, 164:2142–50.
- Mullings, R.E., Wilson, S.J., Puddicombe, S.M., Lordan, J.L., Bucchieri, F., Djukanovic, R., Howarth, P.H., Harper, S., Holgate, S.T., Davies, D.E., 2001, Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108: 832-8.
- Murakami, A., Suminami, Y., Hirakawa, H., Nawata, S., Numa, F, Kato H., 2001, Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death, *Br J Cancer.* 23;84(6):851-8.
- Mutius, V.E., 2009, Gene-environment interactions in asthma, *Allergy. Clin. Immunol.*, 123(1):3-11.
- Nishi, N., Miyazaki, M., Tsuji, K., Hitomi, T., Muro, E., Zaitso, M., Yamamoto, S., Inada, S., Kobayashi, I., Ichimaru, T., Izuhara, K., Nagumo, F., Yuyama, N., Hamasaki, Y., 2005, Squamous cell carcinoma-related antigen in children with acute asthma, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, Mar;94(3):391-7.
- Ober, C., Hoffjan S., 2006, Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.*, 7:95-100.
- Park, J.A., He, F., Martin, L.D., Li, Y., Chorley, B.N., Adler, K.B., 2005, Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C{delta}-mediated mechanism, *Am J Pathol.* Sep;167(3):651-61.
- Postma, D.S., Koppelman, G.H., 2009, Genetics of Asthma:Where Are We and Where Do We Go?, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1;6(3):283-7.
- Raynal, P., Pollard, H.B., 1994, Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1197: 63-93.
- Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M. et al., 1992, Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma, *N. Engl. J. Med.* 326:298–304.

- Rogers, F.D., 2007, Physiology of Airway Mucus Secretion and Pathophysiology of Hypersecretion, *Respir Care*. 2007 Sep;52(9):1134-46; discussion 1146-9.
- Romagnani, S., 1990, Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today*, 11:316-321.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakata, Y., Arima, K., Takai, T., Sakurai, W., Masumoto, K., Yuyama, N., Suminami, Y., Kishi F., Yamashita, T., Kato, T., Ogawa, H., Fujimoto, K., Matsuo, Y., Sugita, Y., Izuhara, K., 2004, The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1, *J. Biol. Chem.*, 279: 5081-5087.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C.H., Keld, B., Giorgi, J.V., 1994, A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry, *J. Immunol. Meth.*, 170:145-157.
- Schneider, S.S., Schick, C., Fish, K.E., Miller, E., Pena, J.C., Treter, S.D., Hui, S.M., Silverman, G.A., 1995, A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92:3147-51.
- Schulz, O., Sewell, H.F., Shakib, F., 1998, Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity, *J. Exp. Med.*, 187: 271-5.
- Sporik, R., Holgate, S.T., Platts-Mills, T.A., Cogswell, J.J., 1990, Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study, *N. Engl. J. Med.*, Aug 23;323(8):502-7.
- Stacey, M.A., Sun, G., Vassalli, G., Marini, M., Bellini, A., Mattoli, S., 1997, The allergen Der p1 induces NF-kappaB activation through interference with I kappa B alpha function in asthmatic bronchial epithelial cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236:522-6.

- Suminami, Y., Kishi, F., Sekiguchi, K., Kato, H., 1991, Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181:51-8.
- Suminami, Y., Nagashima, S., Murakami, A., Nawata, S., Gondo, T., Hirakawa, H., Numa, F., Silverman, G.A., Kato, H., 2001, Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells, *Cancer Res.*, 61:1776-80.
- Suminami, Y., Nagashima, S., Vujanovic, N.L., Hirabayashi, K., Kato, H., Whiteside, T.L., 2000, Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1, *Br. J. Cancer*, 82:981-9.
- Tait, J.F., Gibson, D., Fujikawa, K., 1989, Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein- I, a member of the lipocortin family, *J. Biol. Chem.*, 264: 7944--7949.
- Takeda, A., Higuchi, D., Takahashi, T., Ogo, M., Baciuc, P., Goetinck, P.F., Hibino, T., 2002, Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, Jan;118(1):147-54.
- Thai, P., Chen, Y., Dolganov, G., Wu, R., 2005, Differential regulation of MUC5AC/Muc5ac and hCLCA-1/mGob-5 expression in airway epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Dec;33(6):523-30. Epub 2005 Sep 8.
- Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A., 2008, Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus., *Annu Rev Physiol.*, 70:459-86.
- Uemura, Y., Pak, S.C., Luke, C., Cataltepe, S., Tsu, C., Schick, C., Kamachi, Y., Pomeroy, S.L., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A., 2000, Circulating serpin tumor markers SCCA1 and SCCA2 are not actively secreted but reside in the cytosol of squamous carcinoma cells, *Int. J. Cancer*, 89:368-77.
- Van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K., Kalsheker, N., 2003, Serpins: structure, function and molecular evolution., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Nov;35(11):1536-47.
- Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., et al, 1997, Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents death of resting T cells: Stat-6 is probably not required for the effect of IL-4, *J. Exp. Med.*, 186:325-330.

- Vercelli, D., 2008, Discovering susceptibility genes for asthma and allergy, *Nat. Rev. Immunol.*, 8:169-82.
- Vidalino, L., Doria, A., Quarta, S., Zen, M., Gatta, A., Pontisso, P., 2009, SERPINB3, apoptosis and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.*, Dec;9(2):108-12. Epub 2009 Mar 27.
- Vignola, A.M., Chanez, P., Campbell, A.M., Souques, F., Lebel, B., Enander, I, et al. 1998, Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157:403-9.
- Voynow, J.A., Young, L.R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M.C., Fischer, B.M., Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells., *Am. J. Physiol.*, May;276(5 Pt 1):L835-43.
- Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C.P., Guggenmoos-Holzmann, I., 1997, Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, Jun;99(6 Pt 1):763-9.
- Walker, C., Kaegi, M.K., Braun, P., Blaser, K., 1991, Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 88:935-42.
- Walter, D.M., McIntire, J.J., Berry, G., McKenzie, A.N., Donaldson, D.D., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2001, Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity, *J. Immunol.*, 167:4668-75.
- Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Tovey, E.R., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Stewart, G.A., Taylor, G.W., Garrod, D.R., Cannell, M.B., Robinson, C.. 1999, Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions, *J. Clin. Invest.*, 104:123-33.
- Weiss, S.T., Raby, B.A., Rogers, A., 2009, Asthma genetics and genomics 2009, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 19(3):279-82.
- Woisetschlaeger, M., Stuetz, A.M., Ettmayer, P., 2002, Prevention of immunoglobulin E production as a therapeutic target, *Drug News Perspect.*, 2002, 15(2): 78.
- Wong, C.K., Ho, C.Y., Ko, F.W., Chan, C.H., Ho, A.S., Hui, D.S., Lam, C.W., 2001, Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th

- cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma, *Clin. Exp. Immunol.*, 125: 177-83.
- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R. et al, 1991, Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions, *Science*, 254:277-9.
- Yen, M.Y., Yen, T.C., Panc, C., Liu, J., Wei, Y., 1992, Mitochondrial DNA mutation in Leber's Hereditary Optic Neuropathy, *Invest. Opht. Visual Sci.*, 33,2561 -2566
- Yuyama, N., Davies, D.E., Akaiwa, M., Matsui, K., Hamasaki. Y., Suminami, Y., Yoshida, N.L., Maeda, M., Pandit, A., Lordan, J.L., Kamogawa, Y., Arima, K., Nagumo, F., Sugimachi, M., Berger, A., Richards, I., Roberds, S.L., Yamashita, T., Kishi, F., Kato, H., Arai, K., Ohshima, K., Tadano, J., Hamasaki, N., Miyatake, S., Sugita, Y., Holgate, S.T., Izuhara, K., 2002, Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma, *Cytokine*, 19: 287-96.
- Zurawski, G., de Vries, J.E., 1994, Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells, *Immunol. Today*, 15:19-26.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İbrahim Çağatay KARAASLAN

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Yılı: 1978

Medeni Hali: Bekar

Eğitim ve Akademik Durum

Lise: 1991-1994 Yahya Kemal Beyatlı Lisesi

Lisans: 1995-1999 Hacettepe Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 1999-2002 Hacettepe Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler
Biyoloji A.B.D

Doktora: 2002-2010 Hacettepe Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler
Biyoloji A.B.D

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi: 2002- Hacettepe Üniversitesi Fen
Bilimleri Enstitüsü