

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HASHİMOTO TİROİDİTİ İLE TOLL LİKE RESEPTÖR 2 (TLR 2) VE TOLL LİKE
RESEPTÖR 4 (TLR 4) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA AKTAŞ

OCAK 2018

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HASHİMOTO TİROİDİTİ İLE TOLL LİKE RESEPTÖR 2 (TLR 2) VE TOLL LİKE
RESEPTÖR 4 (TLR 4) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİMDALİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba AKTAŞ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

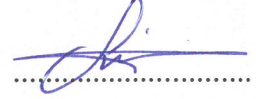
ZONGULDAK

Ocak 2018

KABUL:

Tuğba AKTAŞ tarafından hazırlanan “Hashimoto Tiroiditi İle Toll Like Reseptör 2 (TLR2) ve Toll Like Reseptör 4 (TLR4) Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 08 /01/ 2018

Danışman: Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK



Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Bölümü

Üye: Prof. Dr. Ahmet DURSUN



Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fahriye ZEMHERİ



Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2018



Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”


Tuğba AKTAŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HASHİMOTO TİROİDİTİ İLE TOLL LİKE RESEPTÖR 2 (TLR 2) VE TOLL LİKE RESEPTÖR 4 (TLR 4) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba AKTAŞ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Ocak 2018, 77 sayfa

Hashimoto tiroiditi (HT) otoimmün bir hastalık olup hipotiroidinin en sık görülen nedenidir. HT'li hastalarda tiroid bezinde görülen yaygın lenfosit infiltrasyonu ve vücudun kendi tiroid antijenlerine karşı intolerans gelişmesi, tiroid hücrelerinin harabiyetine ve tiroid fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. HT, bağışıklık sisteminin bir bozukluğu sonucunda ortaya çıkar ve nedeni tam olarak bilinmemektedir. Toll Like Reseptör (TLR)'ler doğal immunitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleridir. TLR'lerin, PAMP'lere veya DAMP'lerle bağlanmasıyla, TLR'lerin intrasitoplazmik domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktifleşir. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler üretilir. TLR'ler inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahiptirler. *TLR* gen polimorfizmleri ile HT arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

ÖZET (devam ediyor)

Çalışmamızda, HT hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde *TLR2* geni Arg677Trp, Arg753Gln, 196-174 del ve *TLR4* geni Asp299Gly, Thr399Ile gen polimorfizm frekansları, TLR-2, TLR-4 serum düzeyleri belirlenmiştir. HT tanısı konan 100 hasta ve herhangi bir inflamatuvar hastalığı olmayan 100 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir.

TLR-2 ve TLR-4 serum düzeyleri açısından HT hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak *TLR2* geni Arg677Trp, Arg753Gln ve 196-174 del ve *TLR4* geni Asp299Gly, Thr399Ile gen polimorfizmleri genotip frekansları ve alel frekansları dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak; *TLR2* geni Arg677Trp, Arg753Gln, 196-174 del ve *TLR4* geni Asp299Gly, Thr399Ile gen polimorfizmleri HT hastalığının gelişiminde etkili olduğu görünmemektedir. Fakat çalışmamızda HT hastalarında, TLR-2 ve TLR-4 serum düzeylerinin kontrollere oranla yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Bu bulgular TLR2 ve TLR4'ün HT hastalığın patogeneğinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HashimotoTiroiditi, Polimorfizm, Arg677Trp, Arg753Gln, -196-174 ins/del, Asp299Gly, Thr399Ile

Bilim Kodu: 401.02.02

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THE ROLE OF THE TLR2 AND TLR4 IN THE PATHOGENESIS OF HASHIMOTO THYROIDITIS

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

January 2018, 77 pages

Hashimoto thyroiditis (HT) is an autoimmune disease and the most common cause of hypothyroidism. The widespread lymphocyte infiltration in the thyroid gland and intolerance of the body against its own thyroid antigens lead to destruction of thyroid cells and impaired thyroid function.

HT occurs as a result of a disorder of the immune system, its cause is not known precisely. TLRs (Toll-like receptors) are type 1 transmembrane proteins that are expressed by macrophages and dendritic cells, which are parts of natural immunity. By binding TLRs to PAMPs or DAMPs, a number of signal transduction pathways are activated through the intracytoplasmic domain of TLRs. As a result, antimicrobial protein and inflammatory cytokines are produced. TLRs play an important role in the initiation of the inflammatory and immune system response. There is no study investigating the relationship between TLR gene polymorphisms and HT. In our study, *TLR2* gene Arg677Trp, Arg753Gln, 196-174 del and *TLR4* gene Asp299Gly, Thr399Ile gene polymorphism frequencies, TLR-2, TLR-4 serum levels were determined in HT patients and healthy volunteers. 100 patients diagnosed with HT and 100 healthy individuals without any inflammatory disease were included in the study.

ABSTRACT (continued)

TLR-2 and TLR-4 serum levels were found to be significantly higher in HT patients than in the control group. However, no statistically significant difference was found between patient and control groups in terms of genotype frequencies and allele frequency distribution of TLR2 gene Arg677Trp, Arg753Gln and 196-174 del and TLR4 gene Asp299Gly, Thr399Ile gene polymorphisms.

As a result; the TLR2 gene Arg677Trp, Arg753Gln, 196-174 del and TLR4 gene Asp299Gly, Thr399Ile gene polymorphism do not appear to be effective in the development of HT disease. As a result; the TLR2 gene Arg677Trp, Arg753Gln, 196-174 del and TLR4 gene Asp299Gly, Thr399Ile gene polymorphism do not appear to be effective in the development of HT disease. However, in our study, serum levels of TLR-2 and TLR-4 were found to be higher in HT patients than control groups. These findings suggest that TLR2 and TLR4 may be effective in the pathogenesis of HT disease.

Keywords: Hashimoto thyroiditis, Polymorphism, Arg677Trp, Arg753Gln, -196-174 ins/del, Asp299Gly, Thr399Ile

Science Code: 401.02.02

TEŞEKKÜR

Moleküler Biyoloji ve Genetik eğitimim ve tezimin tüm aşamalarında her türlü bilgi, destek ve tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel olarak beni aydınlatan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hem tez sürecim, hemde çalışma hayatım boyunca bana her konuda destek olmaya çalışan ve yol gösteren BEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı başkanı Sayın hocam Prof. Dr. Ahmet DURSUN'a, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Güneş ÇAKMAK GENÇ'e, tezim boyunca bana destek olan Dr. Ayça ÇELİKMAKAS ve Nihan YANIK'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Bülent Ecevit Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi İç Hastalıkları Anabilim Dalı hocalarından Doç. Dr. Dilek ARPACI'ya, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Murat CAN'a ve bana her konuda destek olan yardımsever arkadaşım Şirin ARI'ya çok teşekkür ederim.

Eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca çok şey paylaştığım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum yüksek lisans arkadaşlarım Esra ERMİŞ, A.Sebla YAMAK ve İlke ULU'ya destekleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlıkları ile bana güç veren, attığım her adımda bana destek olan annem, babam ve kardeşime; hayatımı güzelleştiren ve kolaylaştıran en büyük desteğim sevgili eşime ve neşe kaynaklarım Defne ve Ahmet Tuğhan'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 HASHİMOTO TİROİDİTİ.....	3
2.1.1 Tanım.....	3
2.1.2 Tarihçe ve Epidemiyoloji.....	4
2.1.3 Patogenez.....	5
2.2 TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER.....	9
2.2.1 Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı.....	11
2.2.2. TLR Ailesi, Lokalizasyonu ve Ligantları.....	11
2.2.3 TLR'lerin Sinyal İletim Yolu.....	14
2.2.3.1 MyD88 Aracılıklı Sinyal Yolağı.....	14
2.2.3.2 TRIF Aracılıklı Sinyal Yolağı.....	15
2.2.4 TLR Ligandları.....	17
2.2.5 TLR Gen Polimorfizmleri.....	17
2.2.5.1 TLR2 Gen Ailesi ve Polimorfizmi (Arg677Trp) (Arg753Gln), (TLR2 ins/del).....	17

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

2.2.5.2. TLR4 Gen Ailesi ve Polimorfizmi (Asp299Gly ve Thr399Ile)	18
BÖLÜM 3 GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 HASTA GRUBU	21
3.2 KONTROL GRUBU	21
3.3 METOD	22
3.3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler	22
3.3.1.1 Kullanılan Cihazlar	22
3.3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.3.1.3 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	23
3.3.1.4 Elektroforez İçin Kullanılan Kimyasallar	23
3.3.2 Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi	24
3.3.2.1 Prensipten	24
3.3.2.2 Protokol	24
3.3.3 PCR İle İlgili Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	25
3.3.3.1 TLR2 Gen Polimorfizmleri (Arg753Gln) (Arg677Trp), ins/del	25
3.3.3.1.1 <i>TLR2</i> (Arg753Gln) (Arg677Trp) Gen Polimorfizmi	25
3.3.3.1.2. <i>TLR2</i> -196-174 ins/del Gen Polimorfizmi (rs111200466)	26
3.3.3.2 <i>TLR4</i> gen polimorfizmi (Asp299Gly ve Thr399Ile)	27
3.3.3.2.1 Asp299Gly polimorfizmi (rs4986790)	27
3.3.3.2.2 Thr399Ile polimorfizmi (rs4986791)	27
3.3.4 Jelin Hazırlanması ve Jel Elektroforezde Görüntüleme	28
3.3.5. RFLP Analizi ve Değerlendirme	28
3.3.5.1. <i>TLR2</i> Gen Polimorfizmi	28
3.3.5.1.1 <i>TLR2</i> Gen Polimorfizmi (Arg753Gln) (Arg677Trp)	28
3.3.5.1.2 <i>TLR2</i> ins/del Gen Polimorfizmi	29
3.3.5.2 <i>TLR4</i> gen polimorfizmleri rs4986790 (Asp299Gly) ve rs4986791 (Thr399Ile)	30
3.3.5.2.1 Asp299Gly polimorfizmi (rs4986790)	30
3.3.5.2.2 Thr399Ile polimorfizmi (rs4986791)	31

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.3.6 SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant).....	31
3.3.7 TLR-2 ve TLR-4 Serum Düzeylerinin Analizi	32
3.3.7.1 TLR-2 Ölçümü	32
3.3.7.1.1 Testin Prensibi	33
3.3.7.1.2 Kullanılan TLR-2 kitinin içeriği ve solüsyonların hazırlanması.....	33
3.3.7.2 TLR-4 Ölçümü	35
3.3.7.2.1 Testin Prensibi	35
3.3.7.2.2 Kullanılan TLR-4 kitinin içeriği ve solüsyonların hazırlanması.....	35
3.3.8 İstatiksel Değerlendirme.....	37
BÖLÜM 4 BULGULAR.....	39
4.1 HASTA VE KONTROL GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ	39
4.2 HASTA VE KONTROL GRUPLARININ <i>TLR2</i> VE <i>TLR4</i> GEN POLİMORFİZM FREKANSLARININ KARŞILAŞTIRMASI	39
4.2.1 <i>TLR2</i> Gen Polimorfizmi	39
4.2.1.1 <i>TLR2</i> rs121917864 (Arg677Trp), rs5743708 (Arg753Gln) Gen Polimorfizmi.....	39
4.2.1.2 <i>TLR2</i> (174-196 del/ins) Gen Polimorfizmi	41
4.2.2 <i>TLR4</i> Gen Polimorfizmi	42
4.2.2.1 <i>TLR4</i> (Asp299Gly) Gen Polimorfizmi.....	42
4.2.2.2 <i>TLR4</i> (Thr399Ile) gen polimorfizmi	43
4.3 SIFT DEĞERLENDİRİLMESİ	44
4.4 SERUM TLR-2 DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	44
4.5 SERUM TLR-4 DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	45
BÖLÜM 5 TARTIŞMA	47
BÖLÜM 6 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
EK AÇIKLAMALAR A	75

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
EK A: Etik Kurul Karar Formu.....	75
ÖZGEÇMİŞ	77



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Hashimoto Tiroditinin Etiyopatogenezi.....	7
Şekil 2.2 İnsan Toll Benzeri Reseptörünün Yapısı	11
Şekil 2.3 TLR'lerin yerleşim yerleri	12
Şekil 2.4 TLR'lerin sinyal yolağı.....	15
Şekil 2.5 TRIF Aracılıklı Sinyal Yolağı.....	16
Şekil 2.6 TLR2 geninin kromozom üzerindeki yeri.....	18
Şekil 2.7 TLR4 geninin kromozom üzerindeki yeri.....	19
Şekil 3.1 TLR2 Arg753Gln, Arg677Trp gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.....	29
Şekil 3.2 TLR2 -196-174 del gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.	30
Şekil 3.3 TLR4 Asp299Gly gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.	30
Şekil 3.4 TLR4 Thr399Ile gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.	31



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Otoimmün tiroidit tipleri.....	3
Çizelge 2.2 TLR ekspresyon, lokalizasyon ve ligandları.....	13
Çizelge 3.1 E.Z.N.A.® Blood DNA mini kit (Omega) içeriği.....	23
Çizelge 3.2 Enzimlerin çalışma koşulları.....	29
Çizelge 3.3 TLR-2 çalışma prosedürü.....	34
Çizelge 3.4 TLR-4 Çalışma prosedürü.....	36
Çizelge 4.1 Hashimoto tiroiditi hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.....	39
Çizelge 4.2 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR2 rs121917864 (Arg677Trp), rs5743708(Arg753Gln)gen polimorfizm genotip frekansları.....	40
Çizelge 4.3 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR2 rs5743708 (Arg753Gln) Gen Polimorfizminin alel dağılımı.....	40
Çizelge 4.4 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR2 I/D rs111200466 gen polimorfizm genotip frekansları.....	41
Çizelge 4.5 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR2 I/D rs111200466 gen polimorfizm alel frekansları.....	41
Çizelge 4.6 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Asp299Gly) gen polimorfizm genotip frekansları.....	42
Çizelge 4.7 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Asp299Gly) Gen Polimorfizminin alel dağılımı.....	43
Çizelge 4.8 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Thr399Ile) gen polimorfizm genotip frekansları.....	44
Çizelge 4.9 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Asp299Gly) Gen olimorfizminin alel dağılımı.....	44
Çizelge 4 10 SIFT sonuçlarının dağılımı.....	44
Çizelge 4.11 HT hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum TLR-2 ve TLR-4 düzeyleri.....	45



EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

Sayfa

EK A: Etik Kurul Karar Formu..... 75





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad Derece
%	: Yüzde
g	: Gram
ng	: Nanogram
mg	: Miligram
L	: Litre
mL	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
kb	: Kilobaz
pg	: Pikogram
nm	: Nanometre
CV	: Değişkenlik katsayısı

KISALTMALAR

3'UTR	: 3' translyasyona uğramamış bölge
A	: Adenin
aa	: amino asit
ANOVA	: Varyans analizi
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CD4+	: Yardımcı T hücreleri
CD8+	: Sitotoksik T hücreleri
CMV	: Sitomegalovirüs
CTLA	: Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DAMP	: Hasara-bağlı moleküler kalıplar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifofat
G	: Guanin
HCl	: Hidroklorit asit
HLA	: İnsan lökosit antijenleri
HMGB1	:Yüksek hareketli grup kutusu 1
HRP	: Horseradish peroksidaz
Hsp	: Isı şok proteini
HT	: Hashimoto Tiroiditi
IFN	: İnterferon
İκB	: NF-κB inhibitörü
IL	: İnterlökin
IL-1R	: İnterlökin-1 reseptör
IRAK	: İnterlökin reseptör ilişkili kinaz
IRF	: İnterferon düzenleyici faktör
KCl	: Potasyum klorür
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösinden zengin tekrar bölgesi
MAL	: MyD88-adaptör bağlayıcı protein
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MHC	: Temel doku uygunluğu bileşeni
Mpr	: Miyeloid ilişkili protein
MS	: Multipl skleroz
MyD88	: Miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NK	: Doğal öldürücü hücreler
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler patern
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	: Patojen tanıma reseptörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

PBMC	: Periferik kan mononükleer hücre
RA	: Romatoid artrit
RFLP	: Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
PTPN	: Protein tirozin fosfataz
SLE	: Sistemik lupus eritematosus
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
ssRNA	: Tek zincir RNA
T	: Timin
TAB	: TAK-bağlayıcı protein
TAK	: TGF- β ile aktive edilmiş kinaz
TBE	: Tris borik asit EDTA
Tg	: Tiroglobulin
TFC	: Tiroid foliküler hücreler
TIR	: Toll- interlökin reseptörü
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TMB	: Tetra metil benzidin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
Tollip	: Toll etkileşimli protein
TPO	: Tiroid peroksidaz
TRAF	: TNF- reseptör ilişkili faktör
TSH	: Tirorid stimüle hormon
TSH-R	: TSH Reseptör antikoru



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hashimoto tiroiditi (HT), otoimmün bir hastalık olup, tiroid bezi yetmezliği olan hipotiroidinin en sık nedenidir. Genel populasyonun %2'sinden fazlasında görülen HT'ne kadınlarda erkeklerden daha fazla rastlanır (Becker 2001, Wang vd. 1997, Tunbridge vd. 2000). Hashimoto hastalarının, % 95'i kadın olup hastalığın görülmesi genelde 30-50 yaş aralığındadır. Hastalık aynı ailenin bireyleri arasında daha sık görülmektedir (Özata 2011). Bu durum hastalığın genetik geçiş gösterdiğini düşündürmektedir. HT, çocuk ve ergenlerdeki guatrın ve kazanılmış hipotiroidinin en sık sebebidir. Değişik derecelerde hücre ve humoral immün yanıtın rol aldığı, tiroid bezinin lenfositik infiltrasyonu ile karakterize, apoptozun aracılık ettiği tiroid hücre ölümü ile sonuçlanan organa özgül otoimmün bir hastalıktır (La Frachi 2008, Fisher vd. 2008, Weetman vd. 1994).

HT patogeneğinde otoimmünite oldukça önemli bir rol oynamakta olup yapılan son çalışmalar TLR sinyallerinin artmış inflamatuvar yanıtı yönlendirdiğini göstermektedir. İnsan TLR'leri, enfeksiyona karşı gelişen doğal ve adaptif (edinsel) immün cevapta rol aldığı düşünülen bir hücre yüzey reseptör ailesi grubuna aittir. Toll-like reseptörler filogenetik olarak iyi tanımlanmış tip I transmembran proteinleridir ve immün cevabın başlamasında anahtar komponentlerdir. Mikroorganizmalara karşı immün cevabın başlamasında, mikrobiyal ürünleri tanıma reseptörleri olarak ve onların primer sensörleri olarak görev alırlar. Doğal immünite ile edinsel immünite arasında ilişki sağlayan en önemli transmembran proteinleridir. İmmün ve inflamatuvar genlerin indüksiyonunu sağlayan sinyal yollarını aktive ederler (Abdollahi-Roodsaz vd.2008). Hücre dışı domainlerinde lösin'den zengin motifler bulunur. TLR'nin sitoplazmada bulunan domaini, IL- 1 reseptör sinyal domaini ile homolog olup IRAK'a (IL-1 receptor associated kinase) bağlanır. IRAK, bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör kappa B'i (NF-κB) aktive ederek sitokin üretimini sağlar (Watanabe vd.2002). Bu reseptörler, meyve sineğindeki (*Drosophila melanogaster*) Toll reseptörlere benzediği için Toll-like reseptörler olarak adlandırılırlar. Günümüzde en az 10 farklı TLR

bilinmektedir. Herbiri farklı mikrobiyal komponentleri tanır. (Ferwerda vd. 2008) TLR2'nin peptidoglikan ve bakteriyel lipopeptidlerle, TLR4'ün gram negatif lipopolisakkaridler (LPS) ile ilişkileri iyi bilinmektedir. TLR sinyallerinin enfeksiyonda ana rolleri iyi bilinmemekle birlikte artmış inflamatuvar yanıtı yönlendirdiği düşünülmektedir (Takeuchi vd. 2010).

İnsan *TLR2* geni kromozom 4q31.3'de bulunur ve 3 ekzondan oluşur. *TLR2* geni için 175 tek nükleotid polimorfizm (SNP) bildirilmiştir. Bu polimorfizmlerin ikisi (Arg753Gln, Arg677Trp), patojen ilişkili moleküler kalıpların bozulması ile ilişkilendirilmiştir. (Merx vd.2007). TLR4 geni kromozom 9q33.1'de bulunur, yaklaşık 13 kb'dir ve 222 amino asitlik bir proteini kodlayan 3 ekzon içerir (Smirnova vd. 2000). TLR4 geninde birçok SNP tanımlanmıştır. Bunlardan Asp299Gly (rs4986790) ve Thr399Ile (rs4986791) polimorfizmleri genin 4. ekzonunda yer almaktadır. Bu iki polimorfizm, proteinin hücre dışı alanını etkiler ve ligand bağlama reseptör alanının değişmesine yol açar. Mutasyona uğramış TLR4 molekülleri, ligand uyarımına daha az tepki verir ve daha az eksprese edilir.

Literatürde *TLR2* ve *TLR4* gen polimorfizmlerinin viral ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (Arbour vd. 2000, Janardhanan vd. 2013, Khan vd. 2014). Ancak HT ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada TLR2 ve TLR4 polimorfizmlerinin ve serum düzeylerinin HT patogenezindeki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 HASHİMOTO TİROİDİTİ

2.1.1 Tanım

HT, lenfositik infiltrasyonu olan diffüz guatr ve tiroid spesifik otoantikorların varlığı ile karakterize organa özgü otoimmün tiroit hastalığıdır. Günümüzde, dünyadaki en yaygın tiroid rahatsızlıklarından biridir ve beslenme iyodunun yeterli olduğu bölgelerde hipotiroidi oluşturur. Yıllık insidansı 1000'de 0.3-1.5'dir. Pozitif antikor testlerinin prevalansı kadınlarda % 10'dan fazla ve klinik hastalıklarda ise en az % 2'dir. Erkekler ise bu prevalansın onda birine sahiptir (Akamizu vd.2012). Hastaların yaklaşık % 95'i kadındır ve sıklıkla 30-50 yaşlarında görülür (Slatosky vd. 2000).

Çizelge 2.1. Otoimmün tiroidit tipleri (Caturegli vd. 2014).

Otoimmün Tiroidit Tipleri	Hastalığın Seyri	Görünüm
HT	Kronik	Büyümüş guatr Lenfositik infiltrasyon Tiroid hücre hiperplazisi
Atrofik Tiroidit	Kronik	Atrofi Fibrozis
Juvenil Tiroidit	Kronik	Lenfositik infiltrasyon
Postpartum Tiroidit	Geçici Kronik tiroidite dönüşebilir	Küçük guatr Lenfositik infiltrasyon
Sessiz Tiroidit	Geçici	Küçük guatr Lenfositik infiltrasyon
Fokal Tiroidit	İlerleyebilir	Otopside %20 oranında

Serum tiroit antikörlerinin yüksekliği ve guatr ile karakterize HT, otoimmün tiroid hastalıkları içinde en yaygın görülen tiptir (En 2003). Otoimmün tiroid hastalıkları, HT'den atrofik lenfositik tiroidite kadar uzayan geniş bir çeşitlilik içerir (Çizelge 2.1). Bu hastalık tipleri arasındaki farklılık değişik miktarda antitiroid antikörlerin üretimine bağlıdır (Drexhage vd.1981). T hücre aracılı otoimmüniteyle oluşan HT etiolojisinde birçok genetik ve çevresel faktör önemli rol oynamaktadır (Chistiakov 2005).

2.1.2 Tarihçe ve Epidemiyoloji

HT, bağışıklık sisteminin bir bozukluğu sonucu ortaya çıkar. Nedeni tam olarak bilinmemektedir. 1912 yılında Japon bilim adamı Dr. Hakaru Hashimoto tarafından tanımlandığı için bu ad verilmiştir. Hashimoto tipi tiroid bezi iltihabı, en fazla hipotiroidi yapan hastalıktır (Brown 2009, Bossowski vd. 2011). HT'nin 1950'lerin sonuna kadar nadir olarak görüldüğü düşünülmeyle beraber günümüzde en sık görülen otoimmün hastalık olduğu bilinmektedir. Yaklaşık her 1000 kişide 1 vaka görülmektedir (Vanderpump vd. 1995).

Otoimmün tiroid hastalıklarının genel popülasyondaki yaygınlığının % 5 olduğu tahmin edilmektedir (Jacobson vd. 1997, Antonelli vd. 2015). Yapılan çalışmalarla HT'nin değişen epidemiyolojisi değerlendirilmiş ve bu çalışmalar göstermiştir ki, kadınlar erkeklere göre daha büyük bir risk altındadır. Hipotiroidizm yaşla birlikte daha sık görülür. HT'nin görülme sıklığı ve yaygınlığı çeşitli coğrafik koşullara, ırka göre değişmektedir. Çevresel faktörler arasında; diyetle iyot alımı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sitokin tedavisi ve gebelik de yer almaktadır (Chistiakov 2005). Diyetle iyodun rolü birçok epidemiyolojik çalışmada ve hayvan modellerinde gösterilmiş olup en önemli çevresel faktör gibi görünmektedir (Boukis vd. 1983, Ruwhof vd. 2001).

Diyetteki iyot miktarının artışı HT ile ilişkili bulunmuştur. Düşük, yeterli veya aşırı iyot alımı olan Çin'deki üç bölgede yapılan bir çalışmada, HT'nin kümülatif insidansı sırasıyla %0.2, % 1 ve % 1.3 'tür (Teng vd. 2006, Teng vd. 2011). Danimarka'da, tuzun iyotlaştırılması için zorunlu bir programın (1997-98) öncesinde ve (2008-10) sonrasında HT insidansının karşılaştırıldığı çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir. İyot ilavesi, tiroperoksidaza antikör oluşumunu artırıp hipotiroidizm insidansını yükseltmiştir (Bjergved vd. 2012). İnsanlarda iyodun imünojenik etki mekanizması tam olarak açıklanamazken farelerde yapılan

araştırmalarda iyot eklenmesinin tiroglobulinin imünojenikliğini artırdığı gösterilmiştir (Carayanniotis 2011, Barin vd. 2005).

Yapılan alışmalarda, HT'ye bağlı hipotiroidi görülme sıklığının yaş ortalaması 57 yaş için, kadınlarda 15 / 1000 ve erkeklerde 1 / 1000 (kadınlara göre daha az) olduğu gösterilmiştir (Tunbridge vd. 1977). Hipotiroidizm ortalama insidansı, kadında 3.5 / 1000 ve erkeklerde 0.6 / 1000 olarak bulunmuştur. Benzer sonuçlar diğer coğrafi bölgelerde kaydedilmiştir (McLeod vd.2012).

Tam etiyoloji henüz bilinmemekle birlikte, HT' nin genetik faktörler, epigenetik etkiler ve çeşitli çevresel tetikleyiciler arasındaki bir etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hasham vd. 2012). İviz alışmaları HT genetik yatkınlık için epidemiyolojik olarak kanıt gösterilmiştir. Tek yumurta ikizleri için HT konkordansı %55 bulunurken, çift yumurta ikizlerinde bu oran bulunamamıştır (Brix vd. 2000). Tiroid otoantikoru da tek yumurta ikizlerinde (%80) ift yumurta ikizlerine (%40) göre daha yüksek oranda konkordans göstermiştir. Aynı zamanda, HT ile HLA-DR immün regülatör genler (CD40, CTLA-4, PTPN22, FOXP3, CD25) ve tiroid spesifik genlerle (tiroglobulin[Tg], tiroid stimüle hormon [TSH] reseptörü) ilişkilendirilmiştir (Menconi vd. 2008).

Sigara, hepatit C virüsü enfeksiyonu veya selenyum eksikliği gibi diğer çevresel faktörler de otoimmün reaksiyonu ve ardından tiroid inflamasyonunu artırabilmektedir (Duntas 2008, Saranac vd. 2011).

Birçok alışmada, HT'nin etyolojisinde viral enfeksiyonların ve doğuştan gelen reseptörlerin rol oynayabileceği gösterilmiştir (Morohoshi vd. 2011). Bununla birlikte, HT gelişiminin kesin mekanizmaları veya bunların HT patogenezindeki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.1.3 Patogenezi

HT, tiroid antijenlerine karşı birbiri ardına gelişen hücresel ve humoral immün yanıtın sonucu oluşan bir hastalıktır. Bu hastalığın büyük bir olasılıkla çevresel uyarıların etkisi ile geliştiği belirtilmektedir. Ancak, hastalığın oluşmasında genetik faktörlerin de rolü vardır (Weetman 2004, Ferwerda vd. 2008). HT'de görülen immünolojik mekanizmada, T hücrelerinin sitokin

sentezi sonucu oluşan tiroid hücre hasarı ve apoptotik hücre ölümü görülmektedir. Otoimmün tiroid hastalığı, T ve B hücreleri de dahil olmak üzere tiroid bezinin lenfoid infiltrasyonu ile karakterizedir. Bu nedenle hem hücresel hem de humoral bağışıklık tiroid otoimmünitesinin patogeneğinde rol oynar (Şekil 2.1) (Chistiakov 2005).

HT'de tiroid bezi çoğunlukla lenfosit ve plazma hücreleriyle infiltre olmuştur. Bu hücrelerden, lenfositlerin % 60'ını T lenfositler, % 30'unu B lenfositler oluşturmaktadır. T lenfositlerini ise; CD4+ (yardımcı), CD8+ (sitotoksik) ve CD8+ (supressör) hücreleri oluşturmaktadır (Ajjan vd. 2015).

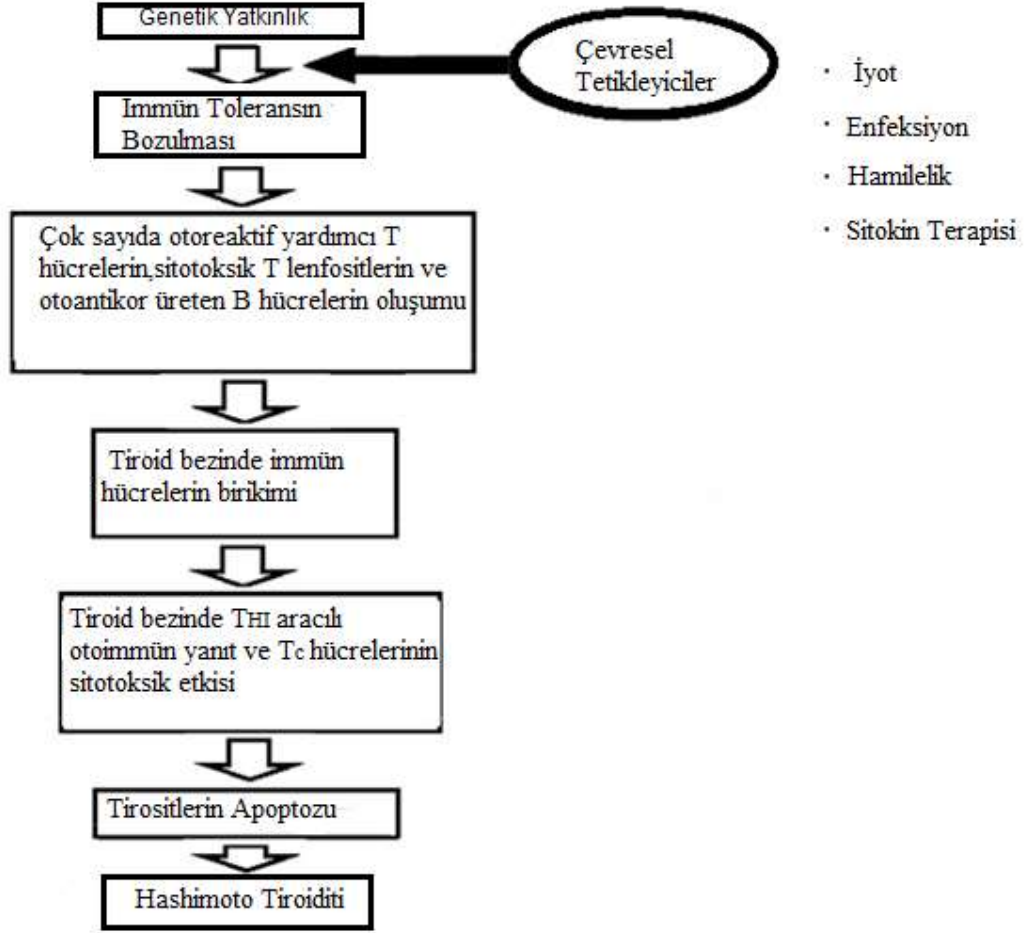
HT'de supressör (baskılayıcı) T hücrelerinde genetik defekt sonucunda hücresel bağışıklığın bozulması meydana gelir. Supressör özelliğe sahip CD8+ T hücreleri HT'de sayıca azalmıştır. CD8+ T hücrelerinin azalması, kendi doku antijenlerine karşı göstermesi gereken toleransın da azalmasına neden olmaktadır. Bu defekt sonucu supressör CD8+ T lenfositleri, yardımcı CD4+ T lenfositlerini baskılayamaz (Dayan vd. 1996, LaFranchi 2004). Aktif olan CD4+ T lenfositleri, B Hücrelerinin tiroid bezinin içine girmesine neden olur. Aktivasyona uğramış T lenfositleri B lenfositleriyle etkileşerek tiroid antijenlerine karşı antikör üretirler (otoantikörler) ki bu da tiroid dokusunda tahribatına neden olur (Dayan vd. 1996, Takami vd. 2008).

Yardımcı CD4+ T lenfositleri B lenfositleriyle etkileşerek interferon-gama (INF- γ)'yı da içeren birçok sitokin salgırlar. Bu sitokinler, tiroid hücreleri sayesinde MHC sınıf II ; Major Histocompatibility Complex (büyük doku uygunluk kompleksi) moleküllerinin üretimini artırır (Chistiakov 2005). Böylece sitokinler tiroisitleri uyararak, MHC-II yüzey antijenlerinin oluşmasına neden olarak tiroid hücrelerini, T hücrelerine antijen sunan hücreler haline getirirler. MHC sınıf II molekülleri HT oluşumunda önemli bir rol oynarlar (Bretz vd. 2001).

HT'de tiroperoksidaz (TPO), Tg, TSH reseptör otoantijenlerine karşı oluşan üç tiroid otoantikoru vardır. Sırasıyla; Tg antikoru, TPO antikoru ve TSH-R bloke edici antikordur (Sinclair 2008). Tiroid otoantikörlerinin de patogeneğinde rolü vardır. Anti-TPO antikörleri TPO enzim aktivitesini inhibe ederler. HT nin erken evrelerinde, Tg antiköründe TPO antikörüne göre daha belirgin bir artış olur. Zamanla Tg antikoru azalarak yok olurken TPO antikoru yıllarca pozitif olarak kalır (Cooper vd. 2009).

HT'de, hastalarda tiroid bezi tahribatına aracılık eden TPO ve Tg' ye ek olarak CD8+ T hücreleri de saptanmıştır (Ehlers vd. 2012). Sitotoksositeye ilaveten, doku tahribatına da neden olup apoptoza işaret eder (Kotani vd. 1995).

Hipotiroidizmin esas mekanizması, sitotoksik T lenfositlerinin tiroid hücrelerini (tirosit) öldürmesi olarak bilinmektedir (Şekil 2.1). HT'nin Etiyopatogenezi açıklanmıştır.



Şekil 2.1 Hashimoto Tiroiditin Etiyopatogenezi (Saranac vd. 2011).

HT doku örneklerindeki tiroid foliküler hücreler (TFC) üzerinde apoptotik molekül Fas ekspresyonunun artışı belirgindir. İn vitro çalışmalar, Fas ekspresyonunun sitokinler tarafından artırılırken, TSH tarafından inhibe edildiğini göstermektedir (Baker 1999). HT doku örneklerinde, kaspaz-3'ün artan regülasyonu ve bcl-2' nin azaltılmış ifadesi de dahil olmak üzere apoptotik hücre belirteçlerinin saptanması, hastalık patolojisinde apoptozun rolünü daha da desteklemektedir (Kaczmarek vd. 2011).

Yeni yapılan çalışmalar, proinflatuar sitokinlerin sadece tiroid hormon sentezinin bozulmasından sorumlu olmadığını, artmış oksidatif stres yoluyla tiroid foliküler hücrelerinin de apoptozuna aracılık edebildiğini göstermiştir (Marique vd. 2014).

Tg ve TPO'ya karşı antikolar hemen hemen tüm HT hastalarında mevcuttur. Tanıya yardımcı olmanın yanı sıra TPO antikoları, özellikle TSH düzeyleri ile kombine edildiğinde, hipotiroidi gelişimini önceden anlamaya yardımcı olabilir (Weetman 2004, Walsh vd. 2010).

TPO'ya karşı dolaşımdaki antikolar HT tanısı koymak için en iyi serolojik gösterge olarak düşünülmektedir. HT hastalarının yaklaşık %95'inde bulunur, ancak sağlıklı kontrollerde nadirdir. TPO antikor titresi, tiroid içine sızan oto reaktif lenfositlerin sayısı ve sonografik hipoekojeniklik derecesi ile ilişkilidir (Pandit vd. 2003). Tiroit bezinin en bol proteini olan Tg'e karşı antikolar, TPO antikolarına göre daha az hassas (HT hastalarının sadece %60-80'inde pozitifdir) ve daha az spesifiktir. (sağlıklı kontrollerin büyük bir kısmında pozitifdir) (McLachlan vd. 2004). Genel olarak, bu bulgular bize tiroid bezine karşı otoimmün yanıtın iki farklı yönünde Tg ve TPO antikolarının etkisini göstermektedir. Tg antikoları, doğuştan bir bağışıklık yanıtı yansıtabilirken, TPO antikoları sonradan oluşan bir edinsel bağışıklık yanıtla karakterize edilebilir (Rose 2007). Bu hipotez doğrultusunda, hastalığın başlangıcında Tg antikoları bulunmalıdır. Fare modellerinde, otoimmün tiroititlerin Tg antikoları, TPO antikolarının ortaya çıkışından önce geldiği gösterilmiştir (Chen vd. 2010). İnsan otoimmün hastalıklarında, hastalık başlangıcı nadiren gözlemlenebilir. HT için, çoğu hasta, klinik bir tanı almadan en az 7 yıl önce bu hastalık görülmeye başlamıştır (Hutfless vd.2011). Bu nedenle, insanlarda TPO antikolarının Tg antikolarından daha yüksek titrelerde olması beklenmektedir (Carle vd. 2006).

İyot, tiroid hormon üretimi için gerekli bir bileşendir. Fakat iyot, çeşitli şekillerde antitiroid bağışıklığı teşvik edebilir. Tg iyodinasyonunun Tg-reaktif T hücreleri tarafından tanınması için çok önemli olduğunu ileri süren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Champion vd. 1991). Yüksek iyotlu tiroglobulin molekülünün, düşük iyot içeren Tg'den daha güçlü bir immünojen olduğu gösterilmiştir (Rasooly vd. 1998, Ebner vd. 1992). Yüksek doz iyotun, makrofajları, dendritik hücreleri, B ve T lenfositlerini doğrudan etkilediği bilinmektedir. Makrofajlardaki miyeloperoksidaz aktivitesinin uyarılmasına, dendritik hücrelerin olgunlaşmasının hızlanmasına, dolaşımdaki T hücrelerinin sayısının artmasına ve B hücresi immünooglobülin üretiminin uyarılmasına neden olduğu gösterilmiştir (Allen vd. 1986).

HLA haplotipleri ile HT ilişkisine dair ortaya konmuş verilerin diğer tiroid hastalıkları tipleri kadar kesinlik içermediği gösterilmiştir. HT'nin, basit bir otoantikör yanıtından, guatr veya tiroid fonksiyonlarının tamamen bozulması ile karakterize atrofik tiroidite kadar giden ve çeşitli klinik bulguları içine alan geniş bir hastalık grubu oluşturduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda beyaz ırkta, HT ile ilişkili HLA allellerinin HLA-DR3, HLA-DR4 ve HLA-DR5 olduğu belirtilmiş; daha sonraki çalışmalarda beyaz ırkta, HLA-DQw7 (DQB1*0301)'in HT ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Farid vd. 1981, Badenhoop vd.1990, Jenkins vd. 1992).

Bugüne kadar HLA-DR, bağışıklık düzenleyici genler (CD40, CTLA-4, PTPN22, FOXP3 ve CD25) ve Tiroit spesifik genleri (tiroglobulin ve tiroit uyarıcı hormon [TSH] reseptörü) gibi birçok lokus Hashimoto hastalığıyla ilişkilendirilmiştir (Menconi vd. 2008). Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA4) ve protein tirozin fosfataz-22 (PTPN22), T hücre aracılı bağışıklık fonksiyonlarının major negatif düzenleyicileridir. T hücre aracılı immun cevabı baskırlar. HT, CTLA4 ve PTPN22 gen polimorfizmleri ile ilişkili bulunmuştur (Tomer 2010). CD40, FOXP3 ve CD25'de periferik toleransın oluşturulmasında kritik roller oynamaktadır. Ayrıca viral enfeksiyonda interferon (IFN)- β üretiminin artması, Tg'nin ekspresyonunu artırarak genetik olarak HT'ne yatkınlığı olan bireylerde T hücre yanıtlarının aktivasyonuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (Stefan vd. 2011).

2.2 TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER

İmmun sistemin kullandığı iki ana savunma sistemi olup doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olarak adlandırılır. Her iki bölümde dışarıdan gelen mikroorganizmalara karşı bir bağışıklık cevap oluşturup, mikroorganizmaları yok etmeye çalışır (Takeda vd. 2003). Tüm hayvan ve bitkilerde var olan immun sistem, patojenlerin tanınmasında toll benzeri reseptör (toll like receptors, TLR) ailesini kullanır.

Toll genleri, protein yapısında olan TLR'leri kodlar. İmmun hücreler üzerinde bulunan ve patojeni tanıyan reseptörler ilk kez 1991 yılında "Drosophila melanogaster" türü sinekte bulunmuş ve "Toll" adı verilmiştir (Gay vd. 1991). Takip eden yıllarda bu genin memelilerde de var olduğu ve hem memeliler hem de omurgasızlarda doğal immunité için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda, TLR'lerin, bakteri bileşenlerini tanımak için önemli moleküller olduğunu ortaya koyulmuştur (Taguchi vd. 1996, Medzhitov vd. 1997).

Doğal immün sistem daha önceden spesifik olmayarak değerlendirilmektedir. Fagositoz, komplemant aktivasyonu ile antimikrobiyal peptid sentezi gibi görevlere sahip olduğu, yabancı maddeler arasında herhangi bir ayırım yapamadığı düşünülmektedir.

Fakat Őimdi, Toll-like reseptörlerin doğal immün sistemin spesifikliğini ortaya koyduğu ve adaptif immün sistemin de aktivasyonunu kontrol ettiği kesin olarak kanıtlanmıŐtır (Kang vd. 2006).

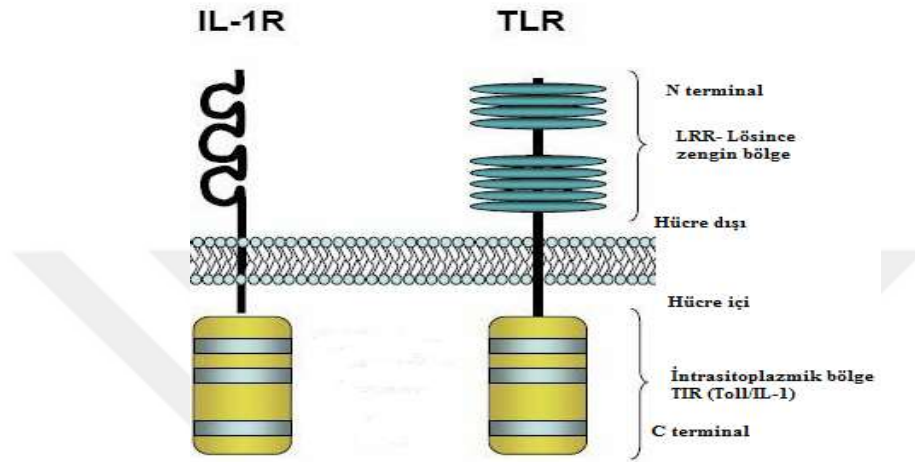
Patojenler üzerinde evrimsel olarak korunmuŐ moleküler yapılara patojen ikiŐkili moleküler yapılar (PAMP; pathogen associated molecular patterns) denilmektedir Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bu yapıları tanıyan reseptörlere de (PRR; Pathogen Recognition Receptor) adı verilmektedir.

Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır. PAMP'ların PRR'ler tarafından tanınması, proinflatuar sitokinlerin, kemokinlerin, tipI interferonun (IFN- α veya IFN- β) indüksiyonunda ve adaptif immünitenin aktivasyonuna neden olan Dendritik hücrelerin olgunlaŐmasına kadar uzanan hücre içi bir sinyal yolunu tetikler (Hoffmann 2003). Son zamanlarda yapılan alıŐmalar, PRR'lerin zarar görmüŐ hücrelerden salınan hasara-bağlı moleküler kalıplar (DAMP) olarak adlandırılan endojen moleküllerin tanınmasından da sorumlu olduğunu göstermektedir (Takeda vd. 2003). PAMP'ler mikroorganizmalardan üretilen, örneğin lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan, flagellin ve mikrobiyal nükleik asitlerden oluşan korunmuŐ moleküllerdir. Oysa oğu DAMP, oksidatif stres ve ısı Şoku proteinleri gibi hüresel stres veya doku hasarı sonucu oluŐmakta olup ölmekte olan konakçı hücre moleküllerinden salınan endojen moleküllerdir (O'Neill 2008).

TLR'ler doğal immünitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleridir. İnsanlarda TLR ilk Nomura ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır. Ancak o zaman meyve sineğindeki Toll'un immün sistemdeki rolü bilinmediğinden bu reseptörün memelilerin gelişiminde rol oynadığı düŐünülmüŐtür (O'Neill 2008, Taguchi vd. 1996). TLR'lerin insanlarda edinilmiŐ immün sistemi de harekete geçirebileceği 1997'de Janeway ve Medzhitov tarafından gösterilmiştir. 1997 yılında, TLR4 olarak bilinen TLR'nin ilk olarak antikorlarla etkileŐtiđinde, uygun bir bağışıklık yanıtı verebileceği saptanmıştır (Medzhitov vd. 1997).

2.2.1 Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı

TLR'ler bir grup PRR olan ve patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem yanıtının başlatılmasında çok önemli bir role sahiptir. TLR'ler, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşmaktadır. Ekstrasellüler bölgesinde lösinden zengin tekrar motifleri (leucine-rich repeat ; LRR) bulunur ve reseptörün ligantları tanımasını sağlar.



Şekil 2.2 İnsan Toll Benzeri Reseptörünün Yapısı (Taguchi vd. 1996)

Sinyal yollarının başlangıcı olan sitoplazmik bölgesi, IL-1R ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve İntraselüler toll/ (IL)-1 reseptör (TIR) domaini olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

TLR'lerin bazıları hücre yüzeyinde ifade olurken, bir kısmı da endositik veziküllerin membranlarında veya intraselüler organellerin yüzeyinde ifade olurlar (Sandor 2005, Andrade vd. 2005, Xu vd. 2004, Trinchieri vd. 2007).

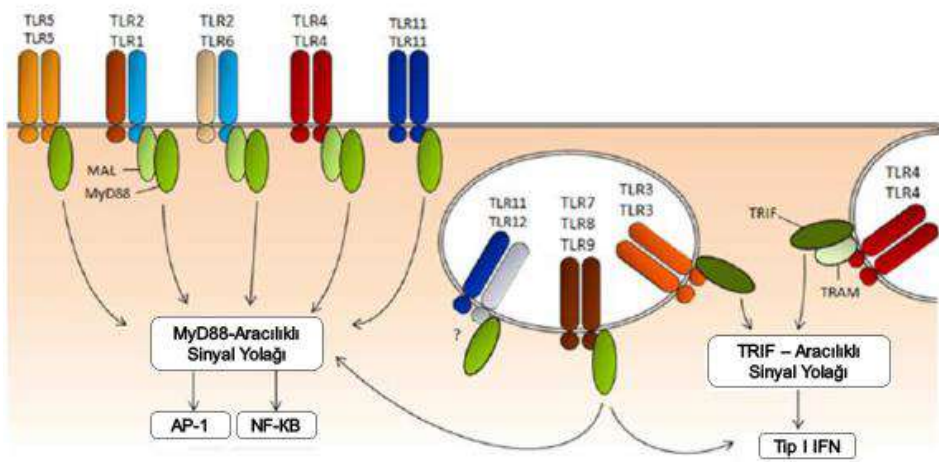
2.2.2. TLR Ailesi, Lokalizasyonu ve Ligantları

Doğal immün yanıtta öncelikle monositler, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), lenfositler ve epitel hücreler rol alırlar (McInturff vd. 2005, Roeder vd. 2004). Bu hücre çeşitlerinin değişik miktarlarda TLR eksprese ettikleri gösterilmiştir (Mukhopadhyay vd. 2004).

Memelilerdeki TLR ailesi, TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-10, TLR-11, TLR-12 ve TLR-13 proteinlerinden oluşmaktadır (Takeda vd. 2005). Çoğu TLR, hücre zarında eksprese edilirken, TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-11, TLR-12 ve TLR-13 yalnızca endoplazmik retikulum, endozomlar, fagosomlar, lizozomlar ve endolizozomlar gibi hücre içi bölümlerin zarlarında eksprese edilir (Roach vd. 2005, Lee vd. 2013, Kawai vd. 2011, He vd. 2014).

TLR4, hücre zarı üzerinde ve ayrıca hücre içi olarak eksprese edilebilir. Bu reseptörün proinflamatuvar hücre yüzeyi sinyali ve anti-inflamatuvar endozomal sinyal iletimi rolleri arasında bir denge bulunmaktadır (Aksoy vd. 2012, Hornef vd. 2003).

Keşfedilen ilk TLR üyesi, gram-negatif bakterilerin dış zar bileşeni olan bakteriyel lipopolisakarit için reseptörün TLR4 olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.3) (Takeda vd. 2003). TLR2, gram pozitif bakterilerin lipoproteinlerini, lipopeptitlerini ve mikoplazma lipopeptidine ek olarak, peptidoglikanlarını da tanır (Takeda vd. 2003, Takeuchi vd. 1999).



Şekil 2.3 TLR'lerin yerleşim yerleri (Hornef vd. 2003).

TLR-2, sırasıyla diaçil ve triaçil lipopeptitlerin moleküler yapılarını ayırt etmek için TLR-1 ve TLR-6 ile işbirliği yaptığı görülmüştür (Takeda vd. 2003). TLR-5, bakteri flagella'sının bir protein bileşeni olan flagellini tanır (Hayashi vd. 2001). TLR-11 eksprese edemeyen farelerin sürekli olarak üropatojenik bakteriyel enfeksiyona duyarlı oldukları gösterilmiş olup, TLR-11'in bu bakterilerin ürünlerini algıladığını göstermektedir. Ancak insanlarda, TLR-11'in bir durdurma kodonu varlığı nedeniyle işlevsiz olduğu düşünülmektedir (Zhang vd. 2004).

TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9 endozomal bölmelerde bulunur ve nükleik asitleri tanımaktadır (Diebold vd. 2004, Heil vd. 2004); TLR-3 viral dsRNA'yı tanır, oysa TLR-7 ve TLR-8 viral ssRNA'yı tanımaktadır (Gorden vd. 2005). TLR-9, bakteri ve viral CpG DNA motiflerini tanır (Hemmi vd. 2000). Ayrıca, dendritik hücrelerle immün komplekslerin TLR'den bağımsız olarak etkinleştirildiğine dair kanıtlar da vardır (Boule vd. 2004, Means vd. 2005). Çizelge 2.2'de TLR'lerin lokalizasyonu, ligandları özetlenmektedir (Latz vd. 2004).

Çizelge 2.1 TLR ekspresyon, lokalizasyon ve ligandları (Latz vd. 2004).

TLR	Tür	Lokalizasyon	Mikrobiyal ligandlar	Endojen ligandlar
TLR-1/2	İnsan ve fare	Plazma membranı	Triaçil lipoproteinler, Peptidoglikan, LPS (lipopolisakkaridler)	Isı şok (heat shock) proteinleri (Hsp60, Hsp70, Hsp90, Gp96) High-mobility group box 1 (HMGB1) Proteoglikanlar
TLR-2/6	İnsan ve fare	Plazma membranı	Diaçil lipoproteinler, Zymosan, Lipoteikoik asit	Isı şok (heat shock) proteinleri (Hsp60, Hsp70, Hsp90, Gp96) (HMGB1) Proteoglikanlar
TLR--3	İnsan ve fare	Endolizozomal membran	Viral dsRNA	mRNA tRNA
TLR-4	İnsan ve fare	Plazma ve endolizozomal membran	LPS (lipopolisakkaridler)	Isı şok (heat shock) proteinleri (Hsp60, Hsp70, Hsp90, Gp96) High-mobility group box 1 (HMGB1) Proteoglikanlar, Fibronektin, Fibrinojen, Tenascin β -Amiloid, Heparan sülfat, Hyalüronik asit, Okside LDL
TLR-5	İnsan ve fare	Plazma membranı	Flagellin	Bilinmiyor
TLR-7	İnsan ve fare	Endolizozomal membran	Viral ve bakteriyel ssRNA	İmmün kompleksler, Self RNA
TLR-8	İnsan ve fare	Endolizozomal membran	Viral ve bakteriyel ssRNA	İmmün kompleksler, Self RNA
TLR-9	İnsan ve fare	Endolizozomal membran	Viral ve bakteriyel CpG DNA, DNA:RNA hibridleri	İmmün kompleksler, Self RNA, Kromatin
TLR-10	İnsan	Plazma membranı	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR-11	Fare	Plazma ve endolizozomal membran	Profilin, Flagellin	Bilinmiyor
TLR-12	Fare	Endolizozomal membran	Profilin	Bilinmiyor
TLR-13	Fare	Endolizozomal membran	rRNA	Bilinmiyor

Nükleik asitleri tanımlayan TLR-3, TLR-7 ve TLR-9, hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilmez, sadece endozomal bölmelerde eksprese edilir (Matsumoto vd. 2003, Latz vd. 2004). Böylece, bakteriler ve virüsler endozoma iletilmek üzere hücre içine alındıktan sonra, TLR'ler tarafından tanınacak olan nükleik asitler serbest bırakıldığında tanıma gerçekleşir.

TLR'lerin, PAMP'lere veya DAMP'lerle bağlanmasıyla, TLR'lerin intrasitoplazmik domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktifleşir. Daha sonrasında antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler üretilir. Dendritik hücrelerin olgunlaşması ve antijen sunumundaki artışla da doğal immün sistem, adaptif immün sistemi uyarmış olur (Barton vd. 2002, Pasare vd. 2004, Andrade vd. 2005).

2.2.3 TLR'lerin Sinyal İletim Yolu

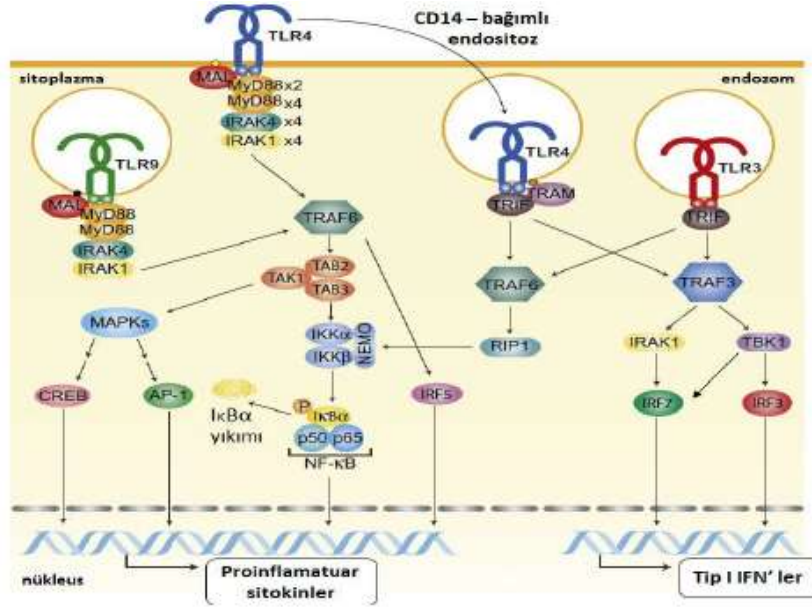
TLR'ler, hücre membranı ve hücre içi sinyal bölgeleri içeren ya plazma zarında ya da hücre içi endolizozomal bölmelerde ifade edilen, tip 1 transmembran glikoproteinlerdir. Sitoplazmik sinyalleme alanında interlökin-1 (IL-1) reseptörü (toll / IL-1R alanı, TIR) ile homolojisinin bir sonucu olarak TLR'ler IL-1R ile aynı yolakları aktive eder (Cole vd. 2010). TLR sinyalleme kaskadı, ligand bağlanması üzerine, bir dizi sitoplazmik adaptör molekül aracılığıyla TIR etki alanı tarafından başlatılır.

Bunlar, miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini (MyD88; Myeloid differentiation primary response protein), TIR- alanını içeren adaptör proteini (TIRAP; TIR domain containing adaptor protein), TRIF; (TIR domain containing adaptor protein inducing IFN β), TRAM; (TRIF related adaptor molecule) içerir (Takeda vd. 2004).

2.2.3.1 MyD88 Aracılıklı Sinyal Yolağı

TLR 3 hariç tüm TLR sinyalleri için MyD88 yolağı gereklidir.

TLR2 ve TLR4 sinyallerinde TLR ve MyD88 arasında bağlantı için TIRAP-MAL (aracı molekül) gerektirir. MyD88, bir N-terminal ucunda ölüm domainine sahip bir serin treonin kinazı olan IRAK-4 ile etkileşir. Toll etkileşimli protein (Tollip) olarak bilinen ikinci bir protein, IRAK'ın TLR4'ün TIR domainine bağlanması için de önemlidir (O'Neill vd. 2013).



Şekil 2.5 TRIF Aracılıklı Sinyal Yolağı (De Nardo 2015).

TLR4 hem MyD88 hem de TRIF aracılıklı sinyal yolağını kullanan tek TLR'dir (Şekil 2.5). Bu sinyal yolağı İnterferon düzenleyici faktör 3 (IRF3) ve NF-κB transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna yol açan TRIF ve TRAM aracılığıyla gerçekleştirilir (Yamamoto vd. 2003). TRIF; TLR3'e direkt olarak bağlanırken, TLR4 sinyalinde ise TRAM aracılığıyla bağlanır (De Nardo 2015). Bu iki yol karşılıklı etkileşimi ve düzenlenmeyi göstermektedir. TRIF'ye bağlı TLR-4 sinyalleşmesinin ana sonucu, antiviral ve antiproliferatif etkinliğe sahip olan tip I interferonların üretilmesidir (Uematsu vd. 2007, Noppert vd. 2007).

MyD88'e bağlı ve TRIF'e bağlı TLR sinyalleşmesi arasındaki denge, bağışıklık fonksiyonu için gereklidir. MyD88'e bağımlı ve MyD88'den bağımsız biçimde NF-κB transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna ek olarak, TLR-2 proapoptotik yolların uyarılmasında da rol oynar. Aliprantis vd. (1999) arkadaşları ilk olarak, bakteriyel lipoproteinlerin invitro olarak monosit apoptozunu indüklediğini göstermiştir (Aliprantis vd. 1999). Daha sonra, MyD88'in TLR2 ile indüklenen apoptoz ve NF-κB aktivasyonunun olağan aracısı olduğunu ve TLR2'nin TNFR ailesinin üyelerine benzer bir şekilde FADD-kaspaz yolu boyunca apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir (Aliprantis vd. 2000, Ashkenazi vd. 1998). İnflamatuvar yanıtı takviye eden veya sonlandıran TLR2 proapoptotik aktivitesinin in vivo uygunluğu ve kronik inflamatuvar süreçlerde spesifik rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2.4 TLR Ligandları

TLR'ler, hem endojen hem de ekzojen ligandların geniş bir yelpazesini bağlayabilmektedir. Öncelikle bakteriyel veya viral patojenlere ait moleküler alanlar için reseptör olarak işlev görürler. Plazma zarında eksprese edilen TLR'ler bakterilerin ve mantarların hücre duvarı bileşenlerini tanımlarken, iç endolizozomal bölmelerde ifade edilenler de viral PAMP'leri bağlar. Mikroorganizma kökenli ekzojen ligandlara ek olarak, TLR'ler çok çeşitli endojen ligandları da bağlayabilir. Bu endojen ligandlar, enfeksiyon yokluğunda TLR sinyali vermeyi uyarıcı konakçı türevi moleküllerdir (Yu vd. 2010, Piccinini vd. 2010). Endojen ligandlar, fibronektin, fibrinojen, hiyalüronik asit türevleri, ısı şoku proteinleri ve minimal oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein gibi çeşitli hücre dışı matris bileşenlerini içerir. Bu ligandlar hücreler tarafından hasarlı bölgeden aktif olarak serbest bırakılır veya inflamatuvar dokular tarafından hasar gören hücreler tarafından pasif olarak serbest bırakılır (Okamura vd. 2001, Smiley vd.2001, Taylor vd. 2007, Vabulas vd. 2001, Bae vd. 2009).

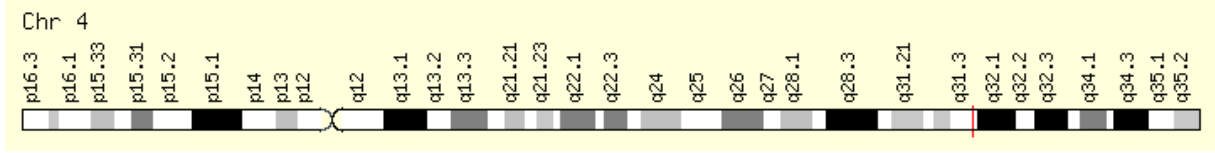
TLR2 ve TLR4, immün sistem savunmasındaki rolüne ilaveten, otoimmün yanıtların başlatılması ve sürdürülmesine de yol açabilir. TLR2 ve TLR4 sinyalizasyon hedefli tedaviler, devam eden inflamatuvar döngüyü kırabilir ve otoimmün hastalıkları iyileştirebilir. Ancak TLR2 ve TLR4'ün otoimmün hastalıklarla olan etkileşiminin esas mekanizması belirsizliğini korumakta olup bu yönde çalışmalar sürdürülmektedir (Liu vd. 2014).

TLR gen polimorfizmlerinin ilgili immün ve immün sisteme ait olmayan hücrelerdeki sinyalizasyonun bozulmasına neden olarak zayıflamış edinsel immün cevaba yol açtığı bilinmektedir. TLR2 ve TLR4 polimorfizmleri romatoid artrit, kanser, astım, tip 2 diyabet gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda gözlenmektedir (Rosa vd. 2012).

2.2.5 TLR Gen Polimorfizmleri

2.2.5.1 TLR2 Gen Ailesi ve Polimorfizmi (Arg677Trp) (Arg753Gln), (TLR2 ins/del)

TLR2 geni, genomda 4q31.3 lokalizasyonunda bulunur ve 3 ekzondan oluşur. TLR2 geni 4200 bp uzunluğunda olup, 784 aa'lık protein sentezleyen bir gen bölgesidir. TLR2 geni üzerinde şimdiye kadar birçok SNP (Tek Nükleotid polimorfizmleri) olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.6 TLR2 geninin kromozom üzerindeki yeri (Url-1).

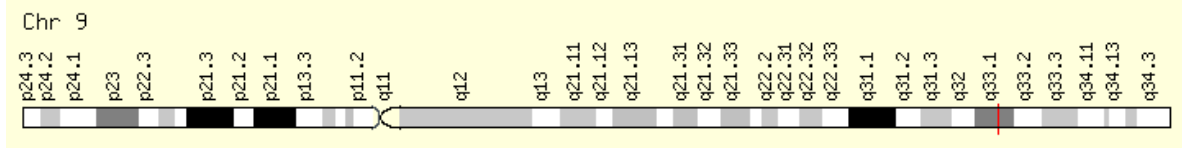
Populasyonda %1 veya daha fazla sıklıkta görülen DNA dizi alternatifleri polimorfizm olarak adlandırılır. SNP'ler, dizideki tek bir nükleotid değişikliği sonucunda oluşan polimorfizmlerdir.

Bu çalışmada, 677. amino asit olan argininin triptofanla (Arg677Trp) yer değiştirmesi, rs121917864 (2029C/T;Arg677Trp) ve 753. amino asit olan argininle glutaminin (Arg753Gln) yer değiştirmesi, rs5743708 (2408G/A; Arg753Gln) olarak adlandırılan polimorfizimlerin HT ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca araştırılan diğer polimorfizm TLR2 (rs111200466) -196 -174 ins/del polimorfizmi olup 5'UTR bölgesinin -196. ile -174. nükleotitleri arasında 23 bp uzunluğundaki bölgenin delesyonuyla oluşmuştur. Bu bölgedeki delesyonun ise azalmış transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yu vd. 2011). TLR'ler arasında TLR2, mikobakteriyel enfeksiyonlarda, oksidatif stresin ve hücrel nekrozun algılanmasında ve apoptozun indüksiyonunda bağışıklık tepkilerinde kritik öneme sahiptir (Petry vd. 2009). İnflamasyon ve bağışıklık sisteminde yer alan TLR genlerinin otoimmün hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle, TLR genindeki tek nükleotid polimorfizimleri ile otoimmün hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır (Karaca vd. 2013). TLR 2'deki tek nükleotid gen polimorfizimlerinin, septik şok veya gram pozitif mikroorganizmalara yatkınlık, *Borrelia*, *Treponema* (Lorenz vd. 2000), *Mycoplasma* türleri (Bochud vd. 2003, Kang vd. 2004) idrar yolu enfeksiyonu (Tabel vd.2007), akut romatizmal ateş (Berdeli vd. 2005) ve ateroskleroza (Bielinski vd. 2011) karşı yanıt vermeyen bağışıklık sistemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

2.2.5.2. TLR4 Gen Ailesi ve Polimorfizmi (Asp299Gly ve Thr399Ile)

TLR4 geni 9q33.1 lokalizasyonunda bulunur, yaklaşık 13 kb'dir ve 222 amino asit uzunluğunda bir proteini kodlayan 3 ekzon içerir (Smirnova vd. 2000). Kromozom 9:117713024 lokasyonundaki başlangıç kodonundan sonraki 896. nükleotide yer almakta olup Adenin (A) bazının yerine Guanin(G) bazının geçmesi ile 299. amino asit olan aspartik asitin

glisinle (Asp299Gly) yer değiştirmesine neden olur. Oluşan varyant rs4986790 (Asp299Gly) (A/G) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır. Kromozom 9:117713324 lokasyonunda, başlangıç kodonundan sonraki 1196. nükleotitte yer alan Sitozinin (C) timin (T) bazının yer değişimi sonucu 399. amino asit threoninin izolösinle (Thr399Ile) yer değiştirmesine neden olur ve oluşan varyant rs4986791 (Thr399Ile) (C/T) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır.



şekil 2.7 TLR4 geninin kromozom üzerindeki yeri (Url-2).

Son yıllarda otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilen polimorfizm sayısı giderek artmaktadır. TLR'ler pek çok hastalığın patogeneğinde yer almakta olup birçok hastalıkla TLR gen polimorfizmlerinin ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. TLR2 ve TLR4'ün doğuştan gelen bağışıklık etkisiyle sitomegalovirüs (CMV)'ye ilişkili olduğu gösterilmiştir. TLR4 Asp299Gly polimorfizmleri, CMV replikasyonunda koruyucu faktör gibi görünmektedir. Buna ek olarak, TLR4, virüslere, gram negatif mikroorganizmalara karşı immün yanıtta kritik bir role sahiptir. Öte yandan, TLR4'deki tek gen polimorfizmlerinin, endotoksinlere (Arbour vd. 2000) gram-negatif enfeksiyonlara (Agnese vd. 2002, Lorenz vd. 2002), ateroskleroza (Kiechl vd. 2002), Crohn hastalığına, ülseratif kolit (Shen vd. 2010) ve Behçet hastalığına (Horie vd. 2009), ailesel Akdeniz ateşine karşı değişen oranda risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ozen vd. 2006). Fakat řu ana kadar *TLR2* ve *TLR4* gen polimorfizmleri ile HT arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışma yapılmamıştır.



BÖLÜM 3

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 HASTA GRUBU

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi İç Hastalıkları Polikliniğinde Hashimoto tiroiditi tanısı konmuş, akraba olmayan 89 kadın, 11 erkek toplam 100 birey hasta grubunu oluşturdu. Hastalara, araştırmanın amacı ve içeriği ile ilgili bilgilendirme ve onam formu okutulup imzalatıldı. Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (Proje numarası 2015-50737594-05) desteklenmiş olup çalışmamızın etik kurul onayı 28.05.2015 tarihinde 2015-24-26/05 numaralı etik kurul toplantısında (Ek-A) alındı.

3.2 KONTROL GRUBU

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi İç Hastalıkları Polikliniğine rutin kontrolleri için başvuran herhangi bir inflamatuvar hastalığı olmayan 84 kadın, 16 erkek toplam 100 sağlıklı birey kontrol grubunu oluşturdu. Sağlıklı bireylere, araştırmanın amacı ve içeriği ile ilgili bilgilendirme ve onam formu okutulup imzalatıldı.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin rutin kontrolleri sırasında verdikleri kandan TLR 2, TLR 4 serum düzeyleri, TLR 2 (Arg677Trp ve Arg753Gln), TLR 4 (Asp299Gly ve Thr399Ile) gen polimorfizmleri çalışıldı. Çalışmalar Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.3 METOD

3.3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Thermal Cyclers (Primus 96 PCR system)
- Buzdolabı (Bosch)
- Santrifüj (Nüve NF 048)
- Vorteks (IKA yellowline TTS2)
- Isı Bloğu (Bio TDB-100)
- Etüv (Nüve EN 500)
- Mikropipet seti (Thermo Scientific- Finnpiquette)
- Mikrodalga Fırın (Altus ALMD 17B)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Cleaver MP-250N)
- Elektroforez Tankı (Blue marine serva 200[®])
- Jel Görüntüleme Sistemi (SYNGENE, GeneGenius Bio Imaging System)
- Derin Dondurucu (Bosch)
- Otoklav (Nüve)
- Hassas Terazı (Rad-Wag)

3.3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- E.Z.N.A.[®] Blood DNA Mini Kit (Omega)
- % 99'luk Etil Alkol
- EDTA
- T1503 SIGMA Trizma[®] base
- Borik Asit
- Ethidium Bromide (Amresco)
- Orange G (SNP Biyoteknoloji)
- Agarose (Biomax)
- PCR Buffer-(NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific)
- dNTP Mix (Fermantes)

- MgCl₂ (Bioron)
- Distile Su
- Taq DNA Polimeraz (Bioron)
- Primerler (Thermo Fisher S.)
- AciI (Thermo Scientific)
- NcoI (Fermantes)
- HinfI (Thermo Scientific)
- 100bp Marker (Thermo Scientific)
- 50bp Marker (Thermo Scientific)

3.3.1.3 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyonu için E.Z.N.A.[®] Blood DNA Mini Kit (Omega) kullanılmıştır. Kit içeriği çizelge 3.1’de verilmiştir. Kit içeriği kullanım klavuzunda verilen bilgiler doğrultusunda aşağıdaki şekilde kullanıma hazırlanmıştır.

HBC Buffer: 80 mL buffer üzerine 32 mL izopropanol eklenmiştir.

DNA Wash Buffer: 25 mL üzerine 100 mL % 100’lük etil alkol eklenmiştir.

Çizelge 3.1 E.Z.N.A.[®] Blood DNA mini kit (Omega) içeriği.

Kimyasal Adı	Miktarı
BL Buffer	60 mL
HBC Buffer	80 mL
DNA Wash Buffer	3x25 mL
Elution Buffer	160 mL
OB Protease Solution	6 mL

3.3.1.4 Elektroforez İçin Kullanılan Kimyasallar

TBE Tamponu (50X Stok Solüsyonu)

- 54 g Tris Base
- 27.5 gr Borik asit

- 3.73 g EDTA
- Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 8.0 ile 8.5 arasında olmalı

Yürütme Tamponu

1litre 1X Stok Solüsyonu TBE için;

- 100 ml 10X Stok Solüsyona 900 ml H₂O eklenir.

% 3 Agaroze Jel Çözeltisi

- 200 ml 1X TBE Buffer
- 6 g Agaroze
- 12µl Ethidium Bromide

% 1.5 Agaroze Jel Çözeltisi

- 200 ml 1X TBE Buffer
- 3 g Agaroze
- 12µl Ethidium Bromide

3.3.2 Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi

3.3.2.1 Prensip

Hücreler tüm nüklezları inhibe eden bir koatropik tuz (guanidin HCL) varlığında proteinaz K ile kısa bir süre inkübe edilir. Bu inkübasyon sonucunda hücreler parçalanır. Açığa çıkan genomik DNA pürüfikasyon filtre tüpünde bulunan fiber glas yapıya seçici olarak bağlanır. Fiber glas yapıya bağlanan genomik DNA'yı kontamine edici hücresel elemanlardan arındırmak ve ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması için yıkama ve satrifüj işlemleri uygulanır. Bu işlem özel bir inhibitör uzaklaştırıcı tampon ve yıkama tamponu ile gerçekleştirilir. Son olarak düşük yoğunluklu tuz elüsyonu ile fiber glasa bağlı genomik DNA bu yapılardan ayrıştırılır.

3.3.2.2 Protokol

Hasta ve kontrollerden tam kan tüpüne 2 cc kan alındı ve DNA, E.Z.N.A[®] Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılarak elde edildi. Kit içinde bulunan ve 1.5 ml hacme sahip tüplerin

içine konan 250 µl kan üzerine; 250 µl Buffer BL, 5 µl RNase A ve 25 µl OB proteaz enzimi eklendi ve bu karışım 10 saniye vortekslendikten sonra önceden 65°C'ye ayarlanmış inkübatörde 10 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde inkübatörden alınan tüplerin üzerine 260 µl saf alkol eklendi ve HiBind® DNA spin kolona aktarıldı. Dakikada 11.000 devir hız ile 1 dakika santrifüj edildikten sonra, alttaki tüp atılarak yeni tüp kondu ve spin kolondaki içeriğin üzerine 500 µl HBC Buffer ilave edildi. Santrifüj aşaması tekrarlandıktan sonra 700 µl Wash Buffer eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Wash Buffer ile yıkama aşaması tekrarlandıktan ve spinler yeni tüpe yerleştirildikten sonra önceden 65°C'ye ayarlanmış inkübatörde ısıtılmış 150 µl Elution Buffer eklendi. Dakikada 11.000 devir hız ile 1 dakika yapılan santrifüj sonrası üstteki spin kolon atılarak alttaki tüpte bulunan DNA yeni tüpe aktarıldı ve bu aşamaların sonucunda yaklaşık 40-60 ng/µl konsantrasyonda 150 µl DNA elde edildi.

3.3.3 PCR İle İlgili Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

3.3.3.1 *TLR2* Gen Polimorfizmleri (Arg753Gln) (Arg677Trp), ins/del

3.3.3.1.1 *TLR2* (Arg753Gln) (Arg677Trp) Gen Polimorfizmi

Kromozom 4:153705165 lokasyonundaki A bazının yerine G bazının geçmesi ile oluşan varyant rs5743708 (*TLR2* G/A; Arg753Gln) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır.

Kromozom 4:153704936 lokasyonundaki T bazının yerine C bazının geçmesi ile oluşan varyant rs121917864 (*TLR2* C/T; Arg677Trp) polimorfizmi olarak tanımlanmıştır.

PCR- RFLP (Restriksyon parça uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile çalışıldı. *TLR2* geninin kodlama bölgesinde yer alan Arg753Gln ve Arg677Trp polimorfizmlerinin her ikisi de Acil enzimi için birer kesim noktası içermekte olup her iki kesim bölgesini de içeren gen bölgesi 5' GCC TAC TGG GTG GAG AAC CT-3' (F) ve 5' GGC CAC TCC AGG TAG GTC TT-3' (R) primer çifti kullanılarak amplifiye edildi. Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂, her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cycler-Primus 96 PCR system" cihazı ile aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

95°C 3 dakika1 Döngü.....(İlk Denatürasyon)
 95°C 1 dakika (Denatürasyon)
 50°C 1.5 dakika }35 Döngü (Bağlanma)
 72°C 1 dakika }(Uzama)
 72°C 7 dakika1 Döngü.....(Son uzama)

343 baz çiftlik (bp) ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler % 1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntüldü.

3.3.3.1.2. *TLR2* -196-174 ins/del Gen Polimorfizmi (rs 111200466)

TLR2 genininde protein kodlamayan 5' bölgesinin -196 -174 lokalizasyonu arasında 23 bp uzunluğundaki 5' CAGGCGGCTGCTCGGCGTTCTCT 3' nükleotidlerin delesyonuyla oluşabilen -196-174 del/ins polimorfizmi (rs111200466) değerlendirildi. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'-CAC GGA GGC AGC GAG AAA-3'(F) ve 5'CTG GGC CGT GCA AAG AAG-3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi. Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂, her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cycler-Primus 96 PCR system" cihazı ile aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

95°C 3 dakika.....1 Döngü.....(İlk Denatürasyon)
 95°C 1 dakika..... (Denatürasyon)
 56°C 1.5 dakika..... }35 Döngü (Bağlanma)
 72°C 1 dakika..... }(Uzama)
 72°C 7 dakika1 Döngü.....(Son uzama)

Amplifiye edilen ürünler % 1,5'lük agaroz jelde koşturularak bant boyları (284 ve/veya 262 bp) görüntüldü.

3.3.3.2 *TLR4* gen polimorfizmi (Asp299Gly ve Thr399Ile)

3.3.3.2.1 Asp299Gly polimorfizmi (rs4986790)

Kromozom 9:117713024 lokasyonundaki G bazının yerine A bazının geçmesi ile oluşan (*TLR4* rs4986790 A/G; Asp299Gly) polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'-GAT TAG CAT ACT TAG ACT ACT ACC TCC ATG-3'(F) ve 5'-GAT CAA CTT CTG AAA AAG CAT TCC CAC-3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi. Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂, her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cycler-Primus 96 PCR system" cihazı ile aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

95°C 3 dakika.....1 Döngü.....(İlk Denatürasyon)
95°C 1 dakika..... (Denatürasyon)
55°C 1.5 dakika..... }.....35 Döngü (Bağlanma)
72°C 1 dakika..... }.....(Uzama)
72°C 7 dakika.....1 Döngü.....(Son uzama)

249 bp ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntülendi.

3.3.3.2.2 Thr399Ile polimorfizmi (rs4986791)

Kromozom 9:117713024 lokasyonundaki T bazının yerine C bazının geçmesi ile oluşan (*TLR4* rs4986791C/T; Thr399Ile) polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. Araştırılmakta olan gen bölgesi 5'-GGT TGC TGT TCT CAA AGT GAT TTT GGG AGA A-3'(F) ve 5'CCT GAA GAC TGG AGA GTG AGT TAA ATG CT-3'(R) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi. Toplam 25 µL hacim içinde her primerden 1.5 pmol, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 80 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L MgCl₂, her bir dNTP'den 0.6 mmol/µL, 4 unit Taq DNA polimeraz ve 4 µL DNA'dan oluşan PCR miksi kullanıldı, "the MWG primus thermal cycler-Primus 96 PCR system" cihazı ile aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

95°C 3 dakika.....1 Döngü.....(İlk Denatürasyon)
95°C 1 dakika..... (Denatürasyon)
65°C 1.5 dakika..... } ...35 Döngü (Bağlanma)
72°C 1 dakika..... }(Uzama)
72°C 7 dakika.....1 Döngü.....(Son uzama)

406 bp ürün elde edildi. Amplifiye edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde koşturularak bant boyları görüntüledi.

3.3.4 Jelin Hazırlanması ve Jel Elektrofrezde Görüntüleme

Konsantrasyonu, PCR sonrası ürünler için %1,5'lik; enzim kesimi sonrası ürünler için %3'lük olacak şekilde tampon çözelti ve agar karıştırılarak mikrodalga fırında 80°C'de ısıtıldı. Karışım, 60°C'ye soğutulduktan sonra üzerine % 7'lik olacak şekilde etidyum bromid eklendi, jel kabına aktarılıp uygun taraklar yerleştirildikten sonra jelin oda ısısında donması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı. İncelenecek örnekten 5 µL alındı ve daha önceden 5 kat distile su ile sulandırılarak 1X olarak hazırlanmış olan 5 µL jel yükleme solusyonu (DZJY001, lot: 0610J12) ile karıştırılarak her bir kuyucuğa yüklendi. Jel tankında (Blue marine serva 200) 120 mV güç kaynağı ile 40 dakika yürütülen örneklerin fotoğrafı, jel görüntüleme cihazı ile (SYNGENE, GeneGenius Bio Imaging System) alındı.

3.3.5. RFLP Analizi ve Değerlendirme

3.3.5.1. *TLR2* Gen Polimorfizmi

3.3.5.1.1 *TLR2* Gen Polimorfizmi (Arg753Gln) (Arg677Trp)

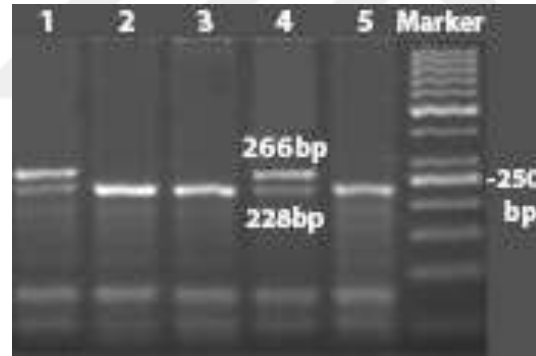
PCR sonrası elde edilen 343 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü %1.5'lik agaroz jel elektrofrez ile görüldükten sonra, 4 ünite *AciI* enzimi (Çizelge 3.2) ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi.

Çizelge 3.2 Enzimlerin çalışma koşulları.

Enzim	Kesim bölgesi	Çalışma sıcaklığı	İnkübasyon süresi
AclI	5'-C [^] CGC-3' 3'-GGC [^] G-5'	37°C	16 saat
NcoI	5'-C [^] CATGG -3' 3'-GGTAC [^] C-5'	37°C	16 saat
HinfI	5'-G [^] ANTC-3' 3'-CTNA [^] G-5'	37°C	16 saat

Enzim kesimi sonrası % 3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütülerek; Arg753Gln gen polimorfizmi G aleli için 228, 74, 38 bp, A aleli için 266, 74 bp boylarında bant elde edildi.

Arg677Trp gen polimorfizmi C aleli için 228, 74, 38 bp, T aleli için 302, 38 bp boylarında bantlar elde edildi. Bu çalışmada 302 baz uzunluğunda bant görülmemiştir (Şekil 3.1).



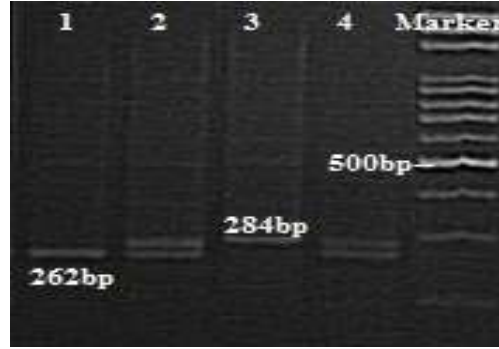
Şekil 3.1 TLR2 Arg753Gln, Arg677Trp gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.

Arg753Gln gen polimorfizmi için 228 bp uzunluğunda görülen bant G, 266 bp uzunluğunda görülen bant A olarak adlandırılmıştır 2,3,5 nolu örnekler GG; 1,4 nolu örnekler GA genotipindedir. Arg677Trp gen polimorfizmi için 228 bp uzunluğunda görülen bant C, 2,3,5 nolu örnekler CC genotipindedir.

3.3.5.1.2 TLR2 ins/del Gen Polimorfizmi

TLR2 -196-174 del gen polimorfizmi için, PCR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünü % 1.5'lik agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi.

Elde edilen ürün 284 bp uzunluğunda ise insersiyon aleli, 262 bp boyunda ise delesyon aleli olarak isimlendirildi (Şekil 3.2).



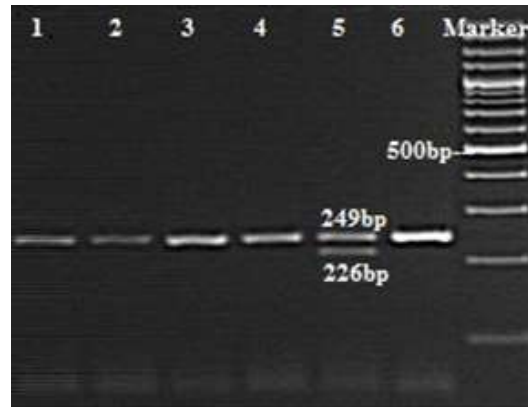
100 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1 nolu örnek del/del; 2,4 nolu örnekler ins/del, 3 nolu örnek ise, ins/ins genotipindedir.

Şekil 3.2 TLR2 -196-174 del gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.

3.3.5.2 TLR-4 gen polimorfizmleri rs4986790 (Asp299Gly) ve rs4986791 (Thr399Ile)

3.3.5.2.1 Asp299Gly polimorfizmi (rs4986790)

PCR sonrası elde edilen 249 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü % 1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile görüldükten sonra, 4 ünite *NcoI* enzimi (Çizelge 3.2) ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi. Enzim kesimi sonrası % 3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütülerek (Şekil 3.3)., A aleli için 249 bp, G aleli için 226 ve 23 bp boyunda bant elde edildi.

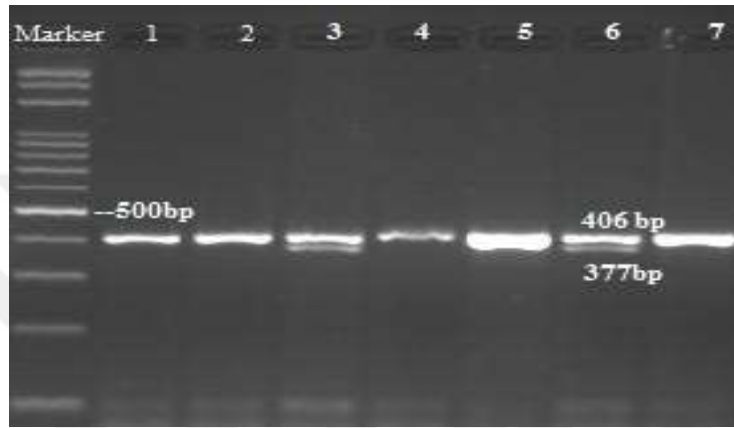


100 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1,2, 3,4,6 nolu örnekler AA; 5 nolu örnek AG, genotipindedir.

Şekil 3.3 TLR4 Asp299Gly gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.

3.3.5.2.2 Thr399Ile polimorfizmi (rs4986791)

PCR sonrası elde edilen 406 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünü %1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile görüldükten sonra, 4 Unit *HinfI* enzimi (Çizelge 3.2) ile kesilmesi için 16 saat 37°C'lik kuru etüvde inkübe edildi. Enzim kesimi sonrası % 3'lük agaroz jelde 120 mV güç ile yaklaşık bir saat yürütülerek C aleli için 406 bp, T aleli için 377 ve 29 bp boyunda bant elde edildi (Şekil 3.4).



100 bp'lık DNA belirtecinin yanındaki 1,2,4,5,7 nolu örnekler CC, 3,6 nolu örnekler CT genotipindedir.

Şekil 3.4 TLR4 Thr399Ile gen polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.

3.3.6 SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)

İnsan genomu, tam genom dizilimi ile tanımlanabilen yaklaşık 3.7 milyon tek nükleotid varyantı (SNV) içerir (Lam vd. 2012). Bir insanda bulunan SNV'lerin çoğunluğu popülasyonda yaygındır, ancak hastalık oluşturan varyantlar tipik olarak özel veya nadirdir ve toplam genomun sadece % 1'ini (30mb) oluşturan protein kodlama bölgelerinde görülme eğilimindedir (Turner vd. 2009, Stenson vd. 2008).

DbSNP (Sherry vd. 2001) ve 1000 Genomes (Abecasis vd. 2010) gibi veritabanları, yaygın varyantları filtrelemek için yararlıdır, ancak kalan varyantların, protein fonksiyonunu potansiyel olarak etkileyebilecek olanları tanımlamak için sıralanması ve önceliklendirilmesi gerekir. Bu açıdan SIFT gibi algoritmalar yardımcı olabilir. SIFT, polimorfizmlerin protein fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmak isteyen araştırmacılar için yararlıdır.

SIFT, amino asit yer değiştirmelerinin protein fonksiyonu üzerindeki potansiyel etkisini gösteren bir algoritmadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla SIFT'i ereve kaydırma kalıplarında görmek için genişletilmiştir (Hu vd. 2012).

SIFT, insan genetik araştırmalarında örneğin, kanserli Mendel hastalıkları ve bulaşıcı hastalıklarda amino asit yer değiştirmeleri için aktif olarak kullanılmaktadır. Araştırmacılar, SIFT'in faydasını, insanlar ve insan hastalıkları üzerine yapılan araştırmaların ötesine geçtiğini vurgulamaktadırlar(Sebro vd. 2012, Wang vd. 2010, Eizadora vd. 2011).

SIFT, missense mutasyonlarının tarımsal bitkiler (Till vd. 2004) ve sıçanlar (Smits vd. 2004), kanin (Gharakhani vd. 2011) ve Arabidopsis (Günther vd. 2010) gibi model organizmalar üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılmıştır.

Genel olarak, SIFT, araştırma çalışmalarının nedensel değişkenleri belirlemek için bol miktarda SNV'ler ile filtrelemeyi gerektiren durumlarda yararlıdır. Bizde bu metodu kullanarak TLR2 ve TLR4 genindeki varyantların protein fonksiyonuna olan etkisini http://siftdna.org/www/SIFT_dbSNP.html linkinden değerlendirdik (Url-2).

3.3.7 TLR-2 ve TLR-4 Serum Düzeylerinin Analizi

Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden TLR-2 ve TLR-4 düzeylerinin araştırılması için sabah 12 saatlik açlık sresinin ardından; pıhtı aktivatörü içeren jel seperatrl tüpe 5 ml venöz kan rneği alındı. Jel seperatrl tüpte pıhtılaşmanın oluşması için 30 dakika beklendi. Pıhtılaşma tamamlandıktan sonra örnek, oda sıcaklığında 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri eppendorf tüplerinde çalışılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. TLR-2 ve TLR-4 lmleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.3.7.1 TLR-2 lm

Serum TLR-2 düzeyinin ölümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan BOSTER firmasının Human TLR-2 Picokine (CA, ABD, Katalog No: EK0906) kiti kullanılarak yapıldı.

3.3.7.1.1 Testin Prensibi

Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarlarında TLR-2'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplıdır. TLR-2 standartları ve örnekler monoklonal antikör kaplı mikrokuyucuklara pipetlenir ve 37 °C'de 90 dakika inkübe edilir. Kuyucuklar boşaltılır ve yıkama yapmadan biotinize anti-human TLR-2 antikörleri eklenir ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir. Bir sonraki aşamada yıkama yapılır. Daha sonra streptavidin-peroksidaz enzimi ortama eklenir ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu enzimin biotinize antikora bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur. İnkübasyon sonunda tekrar yıkama yapıp bağlanmayan enzimler ortamdaki uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenerek karanlık ortamda reaksiyon başlatılır ve 37 °C'de 30 dakika sonunda renk değişimi meydana gelir. İnkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbanansı 450 nanometrede okutulur ve elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, örneklerin TLR-2 konsantrasyonları hesaplanır.

3.3.7.1.2 Kullanılan TLR-2 kitinin içeriği ve solüsyonların hazırlanması

- TLR-2 antikoru ile kaplanmış plak
- TLR-2 standardı
- Biotinize anti-human TLR-2 antikoru
- Streptavidin-Peroksidaz kompleksi
- Örnek dilüsyon solüsyonu
- Antikör dilüsyon solüsyonu
- Streptavidin-Peroksidaz dilüsyon solüsyonu
- Kromojen (Tetrametilbenzidin (TMB)) solüsyonu
- Stop solüsyonu

Standartların hazırlanması:

Örnek dilüsyon tamponu ile standart çözülerek 10.000 pg/ml konsantrasyonundaki ilk stok solüsyon oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 pg/ml konsantrasyonlarda 6 adet standart elde edildi. Örnek dilüsyon tamponu 0 pg/ml olarak kullanıldı.

Biotinize antihuman TLR-2 solüsyonunun hazırlanması:

100 kat konsantre olan biotinize anti-human TLR-2, antikor dilüsyon tamponu ile seyreltildi.

Streptavidin peroksidaz kompleks solüsyonunun hazırlanması:

100 kat konsantre olan streptavidin peroksidaz kompleks, streptavidin-peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi.

Yıkama solüsyonu hazırlanması:

0.01 M PBS (8.5 gr NaCl, 1.4 gr Na₂HPO₄, 0.2 gr NaH₂PO₄ 1000 ml distile suda çözüldü, pH 7.2-7.6 arasındadır ve son hacim 1000 ml'dir). TLR-2 çalışma prosedürü çizelge 3.3'de gösterildi.

Çizelge 3.3 TLR-2 çalışma prosedürü.

	Standart	Örnek
Standart	100 µl	
Örnek		100 µl
37°C'de 90 dakika inkübe edilir. Kuyucuklar boşaltılır		
Biotinize anti-human TLR-2 antikor	100 µl	100 µl
37°C'de 60 dakika inkübe edilir Yıkama cihazında her bir kuyucuk için 300 µl yıkama solusyonu ile 3 kez yıkama		
Streptavidin-Peroksidaz solüsyonu	100 µl	100 µl
37°C'de 30 dakika inkübe edilir Yıkama cihazında her bir kuyucuk için 300 µl yıkama solusyonu ile 5 kez yıkama		
Kromojen solüsyonu	90 µl	90 µl
37°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilir		
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda (ELX 800 G, BIO-TEC Instruments, Winooski,USA) 450 nm'de absorbanlar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Testin ölçüm aralığı 156-10000 pg/ml'dir. Ölçüm sensitivitesi <10 pg/ml'dir ve gün içi değişkenlik katsayısı (CV) %3.8-4.9 iken günler arası CV % 7.9-8.5'dir.

3.3.7.2 TLR-4 Ölçümü

Çalışmada serum solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan Elabscience firmasının ticari Human TLR-4 (Wuhan, PRC, Katalog No: E-EL-H1539) kiti kullanılarak yapıldı.

3.3.7.2.1 Testin Prensibi

Analizde kullanılan mikrokuyucukların duvarlarında TLR-4'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlarla kaplıdır. TLR-4 standartları ve örnekler monoklonal antikor kaplı mikrokuyucuklara pipetlenir ve 37 °C'de 90 dakika inkübe edilir. Kuyucuklar boşaltılır ve yıkama yapmadan biotinize TLR-4 antikorları eklenir ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir. Bir sonraki aşamada yıkama yapılır. Daha sonra avidin-peroksidaz enzimi ortama eklenir ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu enzimin biotinize antikora bağlanması ile sandviç kompleksi oluşur. İnkübasyon sonunda tekrar yıkama yapıp bağlanmayan enzimler ortamdan uzaklaştırılır. Sonrasında ortama substrat solüsyonu eklenerek karanlık ortamda reaksiyon başlatılır ve 37 °C'de 15 dakika sonunda renk değişimi meydana gelir. İnkübasyon sonrasında stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır. Daha sonra renklenmiş ürünlerin absorbansı 450 nm'de okutulur ve elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, örneklerin TLR-4 konsantrasyonları hesaplanır.

3.3.7.2.2 Kullanılan TLR-4 kitinin içeriği ve solüsyonların hazırlanması

- TLR-4 antikoruna ile kaplanmış plak
- TLR-4 standardı
- Standart ve örnek dilüsyon solüsyonu
- TLR-4 biyotinize antikor
- Biyotinize antikor dilüent
- Avidin-Peroksidaz (HRP)
- Avidin-Peroksidaz (HRP) diluenti
- Yıkama solüsyonu
- Kromojen (Tetrametilbenzidin (TMB)) solüsyonu
- Stop solüsyonu

Standartların hazırlanması:

Standart dilüent tamponu ile standart çözülerek 20 ng/ml konsantrasyonundaki ilk stok solüsyon oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 ng/ml konsantrasyonlarda 6 adet standart elde edildi. Standart ve örnek dilüsyon solüsyonu 0 pg/ml olarak kullanıldı.

TLR-4 biotinize antikor:

100 kat konsantre olan TLR-4 biotinize antikor, biyotinize antikor dilüent ile seyreltildi.

Avidin-Peroksidaz (HRP) solüsyonunun hazırlanması:

100 kat konsantre olan avidin-Peroksidaz, avidin-Peroksidaz dilüenti ile seyreltildi.

Yıkama solüsyonu hazırlanması:

30 ml konsantre yıkama solüsyonu 750 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

TLR-4 çalışma prosedürü çizelge 3.4’de gösterildi.

Çizelge 3.4 TLR-4 Çalışma prosedürü.

	Standart	Örnek
Standart	100 µl	
Örnek		100 µl
37°C’de 90 dakika inkübe edilir. Kuyucuklar boşaltılır		
Biotinize TLR-4 antikor	100 µl	100 µl
37°C’de 60 dakika inkübe edilir. Yıkama cihazında her bir kuyucuk için 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama		
Streptavidin-Peroksidaz solüsyonu	100 µl	100 µl
37°C’de 30 dakika inkübe edilir Yıkama cihazında her bir kuyucuk için 350 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama		
Kromojen solüsyonu	90 µl	90 µl
37°C’de 15 dakika karanlıkta inkübe edilir		
Stop solüsyonu	50 µl	50 µl

3.3.8 İstatiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortanca, kategorik yapıdaki veriler için sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Sayısal değişkenler bakımından iki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik ve allelik dağılım farklılıkları ki-kare testiyle değerlendirildi. Hastalık riski ile TLR2 ve TLR4 polimorfizmleri arasındaki ilişki ise lojistik regresyon analizi ile araştırıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirilip ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.





BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1 HASTA VE KONTROL GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ

Bülent Ecevit Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi İç Hastalıkları Polikliniği'nde Hashimoto tiroiditi tanısı almış 89 kadın (% 89), 11 erkek (%11), toplam 100 hasta ve kontrol grubu olarak ise 16 erkek (%16), 84 kadın (%84) sağlıklı 100 birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaşları 16-62 arasında değişip ortalama yaş 38.0 (18.0-62.0) olarak tespit edildi. Kontrol grubunun yaşları 17-68 arasında değişip, ortalama yaş 35.0 (18.0-62.0) olarak tespit edildi. Her iki grup arasında cinsiyet ve yaşa ait özellikler çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Hashimoto tiroiditi hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaşa göre dağılımı

	Kontrol n(%)	Hasta n(%)
Erkek	16 (% 16)	11 (% 11)
Kadın	84 (%84)	89 (% 89)
Yaş	35.0 (18.0-68.0)	38.0 (18.0-62.0)

4.2 HASTA VE KONTROL GRUPLARININ *TLR2* VE *TLR4* GEN POLİMORFİZM FREKANSLARININ KARŞILAŞTIRMASI

4.2.1 *TLR2* Gen Polimorfizmi

4.2.1.1 *TLR2* rs121917864 (Arg677Trp), rs5743708 (Arg753Gln) Gen Polimorfizmi

Hashimoto tiroiditi hastaları ve sağlıklı kontrol grubu *TLR2* Arg753Gln gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 99'inin (%99) GG genotipinde, 1'nin (%1) GA

genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda AA genotipine rastlanmadı. Hasta grubunun ise 97'inin (%97) GG genotipinde, 3'nün (%3) GA genotipinde, olduğu saptandı. Hasta grubunda AA genotipine rastlanmadı. Genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı ($p=0.621$; $OR=3.062$; %95 GA=0.313 – 29.948) (Çizelge 4.2).

TLR2 Arg753Gln gen polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları alel frekansları açısından karşılaştırıldığında G aleli kontrol grubunda % 99.5 hasta grubunda ise %98.5 bulundu. A aleli ise kontrol grubunda %0.5 hasta grubunda ise % 1.5 bulundu. Alel frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.623$; $OR=3.030$; %95 GA=0.313-29.384) (Çizelge 4.3).

TLR2 Arg677Trp gen polimorfizmi açısından incelendiğinde hasta grubunun hepsi CC genotipinde; hastaların hiçbirinde CT ve TT genotipine rastlanmadı. Kontrol grubunda da 100 kişinin tamamının CC genotipinde olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.2 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *TLR2* rs121917864 (Arg677Trp), rs5743708(Arg753Gln)gen polimorfizm genotip frekansları.

SNP	Genotip	Sağlıklı Kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları n=100	P değeri	OR (%95 GA)
<i>TLR2</i> Arg753Gln	GG	99 (%99)	97 (%97)	0.621	Referans 3.062(0.313-29.948)
	GA	1 (%1.0)	3 (%3.0)		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

Çizelge 4.3 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *TLR2* rs5743708 (Arg753Gln) Gen Polimorfizminin alel dağılımı.

SNP	Alel	Sağlıklı kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları	P Value	OR (%95 GA)
<i>TLR2</i> Arg753Gln	G	%99.5	%98.5	0.623	3.030 (0.313-29.384)
	A	%0.5	% 1.5		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

4.2.1.2 *TLR2* (174-196 del/ins) Gen Polimorfizmi

HT hastaları ve sağlıklı kontrol grubu *TLR2* (174-196 del/ins) gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 28'sinin (%28) ID genotipinde, 72'sinin (%72) II genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda DD genotipine rastlanmadı. Hasta grubunun ise 17'sinin (%17) ID genotipinde, 81'inin (%81) II genotipinde, 2'sinin (%2) DD genotipinde olduğu saptandı. Genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı.($p=0.275$) (Çizelge 4.4).

TLR2 (174-196 del/ins) gen polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları alel frekansları açısından incelendiğinde I alel frekansı kontrol grubunda % 86 hasta grubunda ise % 89.5 olarak bulundu. D alel frekansı ise kontrol grubunda % 14 hasta grubunda ise % 10.5 olarak bulundu. Alel frekansları bakımından da kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.360$; OR=0.721; %95 GA=0.394 – 1.317) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *TLR-2* I/D rs111200466 gen polimorfizm genotip frekansları.

SNP	Genotip	Sağlıklı kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları n=100	P değeri	OR (%95 GA)
<i>(TLR2 I/D)</i>	II	72 (%72)	81 (%81)	0.275	Referans 0.540 (0.273-1.066) *
	ID	28 (%28)	17 (%17)		
	DD	0 (%0)	2 (%2)		

• Odds oranı hesaplanamadı

Çizelge 4.5 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *TLR2* I/D rs111200466 gen polimorfizm alel frekansları.

SNP	Alel	Sağlıklı Kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları n=100	P değeri	OR (%95 GA)
<i>(TLR2 I/D)</i>	I	% 86	% 89.5	0.360	0.721 (0.394-1.317)
	D	% 14	% 10.5		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

4.2.2 TLR4 Gen Polimorfizmi

4.2.2.1 TLR4 (Asp299Gly) Gen Polimorfizmi

Hashimoto tiroiditi hastaları ve sağlıklı kontrol grubu *TLR4* Asp299Gly gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 96'sının (% 96) AA genotipinde, 4'ünün (% 4) AG genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda GG genotipine rastlanmamıştır. Hasta grubundaki kişilerin ise 98'sinin (% 98) AA genotipinde 2'sinin (%2) AG genotipinde olduğu saptandı. Hasta grubunda da GG genotipine rastlanmadı. AA, AG, GG genotipleri açısından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.683$; $OR=0.490$; %95 GA=0.088 – 2.737) (Çizelge 4.6).

Asp299Gly gen polimorfizmine ait A ve G alellerinin görülme sıklıkları ile hastalık arasındaki ilişki incelendiğinde ise anlamlı bir ilişki bulunamadı. Kontrol grubunda A alelinin frekansı % 98 hasta grubunda A alelinin frekansı % 99 bulundu. G alel frekansı ise kontrol grubunda % 4 hasta grubunda ise % 1 olarak bulundu ($p=0.685$; $OR=0.495$; %95 GA =0.090 – 2.733) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde *TLR4* (Asp299Gly) gen polimorfizm genotip frekansları.

SNP	Genotip	Sağlıklı kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları	P değeri	OR (%95 GA)
<i>TLR4</i> Asp299Gly	AA	96 (%96)	98 (%98)	0.683	Referans 0.490 (0.088-2.737)
	AG	4 (%4)	2 (%2)		
	GG	0 (%0)	0 (%0)		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

Çizelge 4.7 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Asp299Gly) Gen Polimorfizminin alel dağılımı.

SNP	Alel	Sağlıklı Kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları	P değeri	OR (%95 GA)
<i>TLR4</i> Asp299Gly	A	% 98	% 99	0.685	0.495 (0.090 – 2.733)
	G	% 2	% 1		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

4.2.2.2 *TLR4* (Thr399Ile) gen polimorfizmi

Hashimoto tiroiditi hastaları ve sağlıklı kontrol grubundaki *TLR4* Thr399Ile gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 97'sinde (% 97) CC genotipi; 3'ünde (% 3) CT genotipi saptanırken, TT genotipi saptanmadı. Hasta grubundaki kişilerin 98'sinde (% 98) CC genotipi; 2'sinde (% 2) CT genotipi saptanırken, hasta grubunda TT genotipi saptanmadı. CC, CT, TT genotipleri açısından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=1.000$, $OR=0.660$; %95 GA=0.108-4.036) (Çizelge 4.8).

Thr399Ile gen polimorfizmine ait C ve T alellerinin görülme sıklıkları ile hastalık arasındaki ilişki incelendiğinde, kontrol grubunda C alelinin frekansı % 98.5, T alelinin ki ise % 1.5 olarak bulundu. Hasta grubunda C alelinin frekansı % 99, T alelinin ki ise % 1 olarak bulundu. Allel frekansları bakımından kontrol ve hasta grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamadı ($p=0.686$; $OR=0.663$; %95 GA=0.110 – 4.013) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Thr399Ile) gen polimorfizm genotip frekansları.

SNP	Genotip	Sağlıklı kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları	P değeri	OR (%95 GA)
<i>TLR4</i> Thr399Ile	CC	97 (%97.0)	98 (%98.0)	1.000	Referans 0.660 (0.108-4.036)
	CT	3 (%3.0)	2 (%2.0)		
	TT	0 (%0.0)	0 (%0.0)		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

Çizelge 4.9 Hashimoto tiroiditi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde TLR4 (Asp299Gly) Gen Polimorfizminin alel dağılımı.

SNP	Alel	Sağlıklı Kontroller n=100	Hashimoto tiroiditi hastaları	P değeri	OR (%95 GA)
<i>TLR4</i> Asp299Gly	T	% 98.5	% 99	0.686	0.663 (0.110 –4.013)
	C	% 1.5	% 1		

%95 GA; %95 güven aralığı, OR; Göreceli olasılık oranları (odds ratio)

4.3 SIFT DEĞERLENDİRİLMESİ

Çizelge 4 10 SIFT sonuçlarının dağılımı.

Gen ID	Genin İsmi	SNP	Krm	Koordinat	Referans Aleli	ALT Alel	Amino Asit Değişimi	SIFT Tahmin	Alel Frekansı
ENSG00000137462	TLR2	rs5743708	4	154626317	G	A	R753Q	zararlı	0.007
ENSG00000137462	TLR2	rs121917864	4	154626088	C	T	R677W	zararlı	0.001
ENSG00000136869	TLR4	rs4986790	9	120475302	A	G	D299G	tolere	0.079
ENSG00000136869	TLR4	rs4986791	9	120475602	C	T	T399I	tolere	0.088

4.4 SERUM TLR-2 DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ortalama serum TLR-2 düzeyleri HT hasta grubunda 364.2 ± 291.6 ng/ml, kontrol grubunda 270.1 ± 203.5 ng/ml bulundu. Kontrol ve hasta grubu için ayrı ayrı minimum, maksimum ve

ortanca TLR-2 düzeyleri saptandı. Kontrol ve hasta grubu arasındaki karşılaştırma ortanca değeri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. HT hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki serum TLR-2 düzeyleri açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum 156 ng/ml, maksimum 1582 ng/ml, ortanca 199 ng/ml olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum 164 ng/ml, maksimum 1848 ng/ml, ortanca 249 ng/ml olarak bulundu. Gruplar arasındaki serum TLR-2 düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grubunun serum düzeyi kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.001$) (Çizelge 4.10).

4.5 SERUM TLR-4 DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ortalama serum TLR-4 düzeyleri HT hasta grubunda 12.9 ± 2.5 ng/ml, kontrol grubunda 11.7 ± 2.5 ng/ml bulundu. Kontrol ve hasta grubu için ayrı ayrı minimum, maksimum ve ortanca TLR-4 düzeyleri saptandı. Kontrol ve hasta grubu arasındaki karşılaştırma ortanca değeri üzerinden yapıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı. HT hastaları ve sağlıklı kontrol grubu periferik kandaki serum TLR-4 düzeyleri açısından incelendiğinde kontrol grubunda minimum 6.4 ng/ml, maksimum 18.1 ng/ml, ortanca 11.5 ng/ml olarak bulundu. Hasta grubunda ise minimum 7.6 ng/ml, maksimum 19.5 ng/ml, ortanca 12.4 ng/ml olarak bulundu. HT grubunda serum TLR-4 düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p = 0.02$) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.11 HT hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum TLR-2 ve TLR-4 düzeyleri.

	Kontrol (n=86)			Hasta (n=83)			p
	Minimum	Maksimum	Ortanca	Minimum	Maksimum	Ortanca	
TLR-2 (ng/ml)	156.0	1582.0	199.0	164.0	1848.0	249.0	<0.001
TLR-4 (ng/ml)	6.4	18.1	11.5	7.6	19.5	12.4	0.002



BÖLÜM 5

TARTIŞMA

HT, lenfositik infiltrasyonu olan diffüz guatr ve tiroid spesifik otoantikorların varlığı ile karakterize organa özgü bir otoimmün tiroit hastalığıdır. Dünyada en yaygın görülen tiroid hastalıklarından biri olup beslenme iyodunun yeterli olduğu bölgelerde hipotiroidi oluşturur (Akamizu vd. 2013). Birçok otoimmün hastalıkla HT' i arasında ilişki olduğu bildirilmektedir.

TLR doğuştan gelen bağışıklık sisteminin temel bir düzenleyicisi olup patojene bağlı moleküler kalıpları (PAMP) ve hasara-bağlı moleküler kalıpları (DAMP) taşıyan istilacı organizmaları tanıyan membrana bağlı proteinlerdir (Bae vd. 2009). TLR'lerin PAMP'lar veya DAMP'lar tarafından aktive edilmesi, bir dizi hücre içi sinyal yolunu tetikleyerek inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin düzenlenmesini sağlar (Brown vd. 2011). Doğal bağışıklık sisteminde TLR'ler önemli bir rol oynayarak anti inflamatuvar dengeyi düzenlerler (Estruch vd. 2013).

Otoimmün hastalıklar, otoantikor üretimi ile karakterize inflamatuvar bozukluklardır. Otoimmün hastalıkların mekanizması henüz aydınlatılmamış olsa da, artan kanıtlar TLR'ler ile otoimmünite arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (Sadanaga vd. 2007). Bizim çalışmamızda HT ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla, HT tanısı almış hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda serum TLR-2 ve TLR-4 düzeyleri ölçülmüştür. Gruplar arasındaki serum TLR-2 ve TLR-4 düzeyleri karşılaştırıldığında HT hastalarında hem TLR-2 ($p<0.001$) hem de TLR-4 ($p=0.02$) serum düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir.

Otoimmün hastalıklarla TLR'lerin ilişkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır (Liu vd. 2014). Bu çalışmaların birçoğunda da TLR2 ve/veya TLR4 ekspresyonu ya da düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızla benzer şekilde TLR4 ekspresyonundaki artış ile

romatoid artrit (Radstake vd. 2004), sistemik lupus eritematozus (Kawakami vd. 2007) ve multipl skleroz (Shaw vd. 2011) gibi çeşitli otoimmün hastalıklar arasında ilişki olduğu bulunmuştur.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da, TLR-2 ve TLR-4 düzeyi ile (Tip 1 diyabet) T1D arasında bir bağlantı olabileceği gösterilmiştir (Lien vd. 2009). Geç apoptotik β hücrelerinin, toll benzeri reseptör 2 / MyD88 / nükleer faktör-KB sinyal yolağı yoluyla makrofajlarda iltihaplanma tepkilerini indükleyebileceği ileri sürülmüştür (Lee vd. 2011).

Ayrıca romatoid artrit (RA) hastalarında, TLR-2 ve TLR-4'ün makrofajlar ve sinoviyal fibroblastlarda eksprese edildiği ve ekspresyon düzeylerinin RA hastalarında sağlıklı bireylerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (Radstake vd. 2004, Ospelt vd. 2008). Sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalarında da, TLR-2 ve TLR-4'ün ekspresyonel değişimi ortaya koyulmuştur. Komatsuda A vd. (2008) SLE hastalarının PBMC (periferik kan mononükleer hücre)'lerinde TLR-2 mRNA düzeyinin belirgin olarak arttığını göstermiş, bunun tersine Martina Kirchner vd. (2013) CD14+ monositlerde TLR-4 yüzey ekspresyonunun, kontrollerle karşılaştırıldığında SLE hastalarında dramatik olarak azaldığını tespit etmiştir (Komatsuda vd.2008, Kirchner vd. 2013). Sjogren sendromu hastalarında da tükürük infiltrasyon mononükleer hücrelerinde TLR-2 ve TLR-4'ün kontrollere oranla anlamlı derecede yüksek ekspresyonel düzey gösterdiği belirlenmiştir (Kawakami vd. 2007, Spachidou vd. 2007). TLR-2 ve TLR-4'ün psoriasis patogenezindeki rolleri ise hastalarda periferik kandaki mononükleer hücreler ve keratinositlerdeki TLR-2 ve TLR-4'ün artmış ekspresyonu ile gösterilmiştir (Carrasco vd. 2011). Bunun yanı sıra TLR'lerin Multiple sklerozun (MS) patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda MS hastalarında TLR-2 ve TLR-4'ün ekspresyonel seviyede yükseldiği gösterilmiştir (Shaw vd. 2011). Yapılan tüm bu çalışmalar TLR2 ve TLR4'ün immün sistemin aktivasyonunda önemli rol oynayarak otoimmün hastalıkların patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda TLR'ler, mikrobiyal hücre duvarlarının ya da patojene özgü nükleik asitlerin bileşenlerini tanımlarlar ve böylece NF-K β ve / veya MAPK sinyal yolağını tetikleyerek birçok inflamatuvar sitokin ve kemokinin indüksiyonunda rol oynarlar (Xu vd. 2005). Ayrıca TLR aracılı aktivasyon, başka bir temel sitokin reseptörü olan IL-1R'e çok benzerdir. Hem TLR'ler hem de IL-1R, MyD88 adaptör molekülünü paylaşır ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik eder (Kaisho vd. 2006). HT'nin patogenezinde rol oynadığı düşünülen

bağışıklık reaksiyonları ise IFN- γ gibi spesifik sitokinler tarafından tiroisitlerin uyarılmasıyla başlayıp, daha sonrasında ilgili lökositlerin hücre yüzeyi üzerinde bulunan HLA class I ve class II moleküllerinin ekspresyonuyla devam eder (Weetman 2003). Th2 CD4 + lenfositleri, IL-4, IL-5 ve IL-6 salgımlarken antikor üretimini teşvik ederken, Th1 CD4 + lenfositleri IL-2, INF- γ ve TNF- α salgımlarlar (Woolner vd. 1959). IL-18, T hücreleri ve NK hücrelerinde IFN- γ üretimini uyarabilme yeteneği sayesinde Th-1 yanıtında önemli bir rol oynayan yeni bir pro-inflamatuar sitokin olup Xiao vd. (2008). HT'nin tiroid foliküler hücrelerinde IL-18 ekspresyonu arttığını tespit etmiştir. IL-18 ekspresyonu, IFN- γ tarafından artırıldığı belirlenmiştir. Bu durum, IL-18 ile IFN- γ arasındaki etkileşimin, HT'de tiroit hasarında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Xiao vd. 2008). Figueroa-Vega vd. (2010) HT'li hastalarda yüksek düzeyde IL-6 ve IL-15 tespit etmişlerdir (Figueroa-Vega vd 2010). Başka bir çalışmada da ötroid HT hastalarında normal kontrol grubuna göre IL-12 ve IL-18 düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (Zhang vd 2006). Yakın zamanda, Guo H vd. (2014) ise yeni tanı alan HT hastalarında serum IL-22, IL-17A ve IFN- γ düzeylerinin sağlıklı kişilerinkinden anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir (Guo vd 2014).

Ayrıca Qin vd. (2012) da HT hastalarının tiroid dokularında artmış IL-23 ve IL-17A'nın ekspresyonunu göstermişlerdir (Qin vd. 2012). Giordano vd. (1997) İmmünohistokimya analizini kullanarak HT hastalarının tiroid dokusu numunelerinde yüksek seviyede IL-1 β ekspresyonu tespit etmişlerdir (Giordano vd. 1997).

Yapılan araştırmalara rağmen, tiroid otoimmünesinin başlatılması ve ilerlemesinin kesin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Peptidoglikan, lipoteikoik asit ve TLR2 veya TLR4 ile bağlanan lipopolisakaritler gibi ekzojen ligandların, insan sinovyal fibroblastlarında ve RA hastalardaki periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) IL-6 ve IL-17 gibi pro-inflamatuar sitokinler ve kemokin üretimini artırabileceğini bununda inflamasyonu ve dejenerasyonu tetikleyeceği gösterilmiştir (Chovanova vd. 2013, Tang vd. 2010, Lorenz vd. 2013). Fare modellerinde, LPS ile TLR4 aktivasyonu kollejen kaynaklı artırt insidansını artırmıştır (Hou vd. 2013). Başka bir çalışmada, Loser K vd. (2010) sistemik otoimmünesinin gelişimi için gerekli olan, yerel miyeloid ilişkili protein-8 (Mrp8) ve Mrp14'un, otoreaktif CD8 + T hücrelerini uyarabildiğini ve TLR4 sinyali yoluyla interlökin-17 (IL-17) ekspresyonunu artırabildiğini bulmuştur (Loser vd. 2010). Sistemik sklerozis (SSc)' li hastalarda, TLR2 ya da TLR4 yoluyla ligandlar tarafından dentrik hücrelerin

uyarımı, IL-6, IL-10 ve TNF α salınımının artmasına ve IL-12 üretiminin azalmasına neden olmuştur (Van Bon vd. 2010). Dentrik hücrelerin yanı sıra, TLR4 de fibroblastların yüzeyinde eksprese edilir ve TLR4'ün aktivasyonu, fibroblastlar yoluyla profibrotik ve proanjiyojenik kemokinlerin üretiminin artırılmasına katkıda bulunur (Fineschi vd. 2008).

Sonuç olarak, TLR2 ve TLR4 sinyal yollarının; IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23 gibi sitokinlerin ekspresyon düzeyinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bu sitokinlerin HT hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bizim sonuçlarımız da yapılan bu ekspresyon ve düzey çalışmalarını destekler niteliktedir. Ayrıca çalışmamız HT hastalarında TLR-2 ve TLR-4 serum düzeylerinin yüksek olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Diğer çalışmalarda göz önünde bulundurularak bizim sonuçlarımız değerlendirildiğinde, TLR2 ve TLR4'ün proinflamatuvar yanıtta artışa neden olarak HT hastalığının immünopatolojik mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda ayrıca *TLR-2* geni Arg677Trp rs121917864, Arg753Gln rs5743708, -196-174 del polimorfizmleri ve *TLR4* geni Asp299Gly rs4986790, Thr399Ile rs4986791 polimorfizmleri çalışılmıştır.

TLR2 Arg677Trp gen polimorfizmi açısından incelendiğinde hem hasta grubunun hem de kontrol grubunun hepsinin CC genotipinde olduğu tespit edilmiş olup CT ve TT genotipine rastlanmamıştır.

TLR2 Arg753Gln gen polimorfizmi açısından incelendiğinde ise kontrol grubunda 99 bireyin (%99), hasta grubunda ise 97 bireyin (%97) GG genotipinde, olduğu saptanmıştır. Kontrol ve Hasta grubunda AA genotipine rastlanmamış ve genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.621$). Alel frekansları açısından da kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.623$).

TLR2 (174-196 del/ins) gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun 28'sinin (%28) ID genotipinde, 72'sinin (%72) II genotipinde olduğu saptanmış olup kontrol grubunda DD genotipine rastlanmamıştır. Hasta grubunun ise 17'sinin (%17) ID genotipinde, 81'inin (%81) II genotipinde, 2'sinin (%2) DD genotipinde olduğu belirlenmiştir. Genotip ve alel frekansları açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.275$, $p=0.360$).

TLR4 Asp299Gly gen polimorfizmi açısından incelendiğinde kontrol grubunun % 96'sının Hasta grubunun % 98'sinin AA genotipinde olduğu saptanmış olup hasta ve kontrol grubunda GG genotipine rastlanmamıştır. AA, AG, GG genotipleri açısından ve alel frekansları bakımından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.683$, $p=0.685$).

TLR4 Thr399Ile gen polimorfizmi açısından incelendiğinde de kontrol grubunun %97'sinin ve hasta grubunun %98'sinin CC genotipinde olduğu saptanmış ancak hasta ve kontrol grubunda TT genotipi saptanmamıştır. Genotip ve alel frekansları açısından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (sırasıyla, $p=1.000$, $p=0.686$).

TLR4 polimorfizmleri ve etkileriyle ilgili tam bir görüş birliği yoktur. Yapılan bazı çalışmalarda TLR4 polimorfizmi olan kişilerde LPS sinyalinde bir eksiklik olmadığı da gösterilmiştir (Von Aulock vd. 2003). Örneğin, Van der Graaf vd. (2005) mononükleer hücreleri ekzojen ve endojen TLR4 ligandlarıyla uyardıklarında, Asp299Gly polimorfizminin proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinleri etkilemediğini göstermişlerdir (Van der Graaf vd. 2005). Bizim çalışmamızın SIFT bulguları bu çalışmayı destekler nitelikte olup, *TLR4* Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin protein üzerine etkisi tolere edilebilir ölçüde bulunmuştur. SIFT analizi sonucunda *TLR2* Arg677Trp ve Arg753Gln varyasyonlarının ise, zararlı etkiyi gösteriyor olabileceği bulunmuştur. Ancak bizim yaptığımız çalışma sonucunda HT patogenezi ile bu polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

TLR2 ve TLR4 genlerindeki polimorfizmlerin romatoid artirit (Lee vd. 2014), psöriazis (Garcia-Rodriguez vd. 2013), MS (Bustamante vd. 2011), vitiligo (Figuroa-Vega vd. 2010), ateroskleroz (Kiechl vd. 2002), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (Shen vd. 2010) gibi kronik hastalıklarla ilişkilendirildiği de birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, TLR4 geninde en fazla araştırılan genetik varyantlar Asp299Gly ve Thr399Ile, TLR2 geninde de Arg753Gln olmuştur. TLR'nin farklı varyantları, TLR fonksiyonunda değişime neden olarak patojenlere yanıtı değiştirebilir. Sonuç olarak şüphesiz TLR'ler doğal immün cevabın bir parçası olarak HT'de inflamatuvar yanıtı etkilemektedir. Ancak yaptığımız çalışma araştırılan polimorfizmler ile HT arasında anlamlı bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur.

Son yıllarda, çok sayıda araştırma grubu, TLR polimorfizmleri ile RA duyarlılığı veya şiddeti arasındaki korelasyonun belirlenmesine yönelik çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmaların çoğu, TLR4'ün iki fonksiyonel varyantı olan Asp299Gly ve Thr399Ile'ye (D299G / T399I) odaklanmıştır (Ohto vd. 2012). Ancak TLR4 polimorfizmi ile RA arasında bir ilişki olmamasına karşın, TLR2 geninin intron II'sindeki guanin-timin [(GT) (n)] tekrarlarının sayısı polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde Koreli RA hastalarında S allel sıklığının kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Van der Graaf vd. 2005, Xu vd. 2012).

Castiblanco J. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise TLR2 (Arg677Trp ve Arg753Gln) ve TLR4 (Asp299Gly ve Thr399Ile) gen polimorfizmlerinin SLE duyarlılığı veya şiddeti ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Castiblanco vd. 2008). Behçet Hastalığı ile TLR4 gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada da benzer şekilde TLR 4 gen polimorfizminin Behçet hastalığının klinik bulgularına, şiddetine herhangi bir etkisi olmadığı ve hastalığa yatkınlığa neden olmadığı gösterilmiştir (Boiardi vd. 2009). Ayrıca Türkiye'de de *TLR2* geni Arg753Gln polimorfizmi ile Behçet hastalığı arasındaki ilişkinin araştırıldığı 2 çalışmada da anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Bacanli vd. 2006, Coşan vd. 2009). Bu çalışmalardan farklı olarak *TLR4* Asp299Gly gen polimorfizminin sepsis riskini artırdığını göstermiştir. Buna ek olarak, Thr399Ile polimorfizminin de travma sonrası sepsis şiddeti ile ilişkili olduğunu belirtilmiştir (Barber vd. 2006, Barber vd. 2004). Shi vd. (2016) yaptıkları çalışmada güney Çin popülasyonunda *TLR2* rs3804099 polimorfizminin psoriasisle yatkınlıkla ilişkili olduğu bulunmuş, bizim de çalıştığımız *TLR2* Arg677Trp ve Arg753Gln ile *TLR4* Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini katılımcıların hiçbirinde saptayamadıklarını bildirmişlerdir (Shi vd. 2016). Benzer şekilde Noguchi vd. (2004) Japon popülasyonunda astım hastalarında yaptıkları bir çalışmada da *TLR4* Asp299Gly değişimi saptanmamıştır (Noguchi vd. 2004). Bu polimorfizmlerin saptanamaması muhtemelen etnik farklılıklarla açıklanabilir. Bizim çalışmamızla benzer şekilde Schürman vd. (2008) sarkoidoz hastaları, Urcelay vd. (2007) multiple skleroz hastaları, Berdeli vd. (2007) jeneralize agresif periodontit hastaları, Kolz M vd. (2008) tip II şeker hastaları ile yaptıkları çalışmalarda *TLR4* gen polimorfizmleri ile çalışılan hastalıklar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Schürman vd. 2008, Urcelay vd. 2007, Berdeli vd. 2007, Kolz vd. 2008).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda *TLR2* geni Arg753Gln, Arg677Trp ve -196-174 del polimorfizmlerinin *TLR 4* geni Asp299Gly, Thr399Ile polimorfizmlerinin birçok otoimmün

hastalıkla ilişkili olup olmadığına bakılmıştır. N. Inoue vd. (2015)'de otoimmün tiroid hastalıkları ile yaptıkları bir çalışmada, 20 SNP bakmışlar ve sadece TLR4 geni 3' UTR varyantı olan rs41426344 polimorfizminin GC + CC genotiplerinin, tiroid hasarına ve hipotiroidiye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Inoue vd. 2015). Fakat literatürde HT ile bizim çalıştığımız polimorfizmlerle ilgili yapılmış çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer polimorfizm, TLR2 -196-174 ins/del polimorfizmidir. 5'UTR -196 ile -174. nükleotitleri arasındaki 22 bp uzunluğundaki bölgenin delesyonu sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bu delesyonun genin promotör aktivitesini etkilediği bildirilmiştir (Mandal vd. 2012). Bu polimorfizm ile ilgili olarak Noguchi vd. (2004) del alelinin azalmış transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğu göstermiştir. Ancak bu çalışmada *TLR2* -196-174 del polimorfizmi ile astım arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (Noguchi vd. 2004). *TLR2* geni -196-174 del polimorfizminin inflamatuvar süreçteki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda 196-174 del polimorfizminin HT ile bir ilişkisi olmadığı bulunmuştur.

TLR'ler çok sayıda hastalığın patojenik seyrinde yer alır ve bulaşıcı hastalıklar, tümörler, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve alerji ile yakından alakalıdır (Liu vd. 2016). TLR2 ve TLR4 hakkındaki araştırmalar arttıkça, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bazı koşullar altında çift taraflı bir etki gösterebileceğinin kabul edilmesine neden olmuştur. TLR'ler savunmadaki yararlı rollerine ilaveten, otoimmün yanıtların başlatılması ve sürdürülmesine de yol açabilir (Liu vd. 2014). TLR'lerin inflamasyonlu dokulardaki metabolik değişiklikleri yönlendirmedeki rolü ve TLR'lerin düzenlenmesinde epigenetik faktörlerin rolü de düşünüldüğünde TLR mekanizmasının karmaşıklığı anlaşılmaktadır. Bu alanda yapılacak ileri çalışmalar hastalığın tanısında ve tedavisinde yeni fırsatlar ortaya çıkabilir (Joosten vd. 2016).

Bir çok çalışma, TLR2 ve TLR4 yolaklarının otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir ve bu mekanizmalar yapılan araştırmalarla daha net bir hale gelmektedir. Bu sonuçlar, terapötik seçenekler sunmaktadır. TLR2 ve TLR4'ün yanı sıra onların ligandları, adaptörleri, negatif regülatörleri ve hatta TLR'leri hedefleyen mikroRNA'lar müdahale hedefleri olabilir. Küçük moleküller bu hedefleri aktive veya inhibe ederek otoimmün hastalıkların seyrini değiştirebilir. Farklı moleküller, inflamatuvar etkilerini düzenlemek için TLR2 veya TLR4 sinyal yollarındaki farklı bileşenleri hedefleyebilir ve

böylece otoimmün hastalıkların iyileşme sürecine pozitif yönde katkı sağlayabilir (Li vd. 2013). TLR2 ve TLR4 sinyalizasyon hedefli tedaviler, devam eden inflamatuvar döngüyü kırabilir ve otoimmün hastalıkları iyileştirebilir. Ancak, TLR2 ve TLR4'ün otoimmün hastalıklarla olan etkileşiminin sonucunda oluşan mekanizmalar belirsizliğini koruyor; bu nedenle bu doğrultuda konu ile ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.



BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Hashimoto tiroiditi (HT), otoimmün bir hastalık olup, tiroid bezi yetmezliği olan hipotiroidinin en sık nedenidir. Değişik derecelerde hücresel ve humoral immün yanıtın rol aldığı, tiroid bezinin lenfositik infiltrasyonu ile karakterize, apoptozun aracılık ettiği tiroid hücre ölümü ile sonuçlanan organa özgül bir otoimmün hastalıktır. Hastalık aynı ailenin bireyleri arasında daha sık görülmektedir. Bu durum hastalığın genetik geçiş gösterdiğini düşündürmektedir. HT patogeneğinde otoimmünite oldukça önemli bir rol oynamakta olup yapılan son çalışmalar TLR sinyallerinin artmış inflamatuvar yanıtı yönlendirdiğini göstermektedir. Doğal immünite ile edinsel immünite arasında ilişki sağlayan en önemli transmembran proteinleridir. İmmün ve inflamatuvar genlerin indüksiyonunu sağlayan sinyal yollarını aktive ederler.

Çalışmamızda HT ile *TLR-2* geni Arg677Trp rs121917864, Arg753Gln rs5743708, -196-174 insdel polimorfizmleri ve *TLR-4* geni Asp299Gly rs4986790, Thr399Ile rs4986791 polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmış olup elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. *TLR2* Arg677Trp rs121917864, Arg753Gln rs5743708 gen polimorfizmi için genotip ($p=0.621$) ve alel frekansları ($p=0.623$) açısından HT hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.
2. *TLR2* -196-174 del polimorfizmleri genotip ve alel frekansları açısından HT hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.275$, $p=0.360$).
3. *TLR4* Asp299Gly rs4986790 gen polimorfizmi için genotip ($p=0.683$) ve alel frekansları ($p=0.685$) açısından HT hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır

4. *TLR4* Asp299Gly rs4986790 gen polimorfizmi için genotip ($p=0.683$) ve alel frekansları ($p=0.685$) açısından HT hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.
5. *TLR4* Thr399Ile rs4986791 gen polimorfizmi için genotip ($p=1.000$) ve alel frekansları ($p=0.686$) açısından HT hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.
6. Serum TLR-2 düzeyleri ile HT hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında HT hastalarında serum düzeyi ($p<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.
7. Serum TLR-4 düzeyleri ile HT hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında HT hastalarında ($p=0.02$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.
8. SIFT bulguları TLR2 için zararlı edilebilir ölçüde bulunmuştur.
9. SIFT bulguları TLR4 için tolere etkiye gösterebilir ölçüde bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda, TLR2 ve TLR4 düzeylerinin HT patogenezinde rol oynadığını, bu yolla inflamatuvar sitokin seviyelerindeki artışın HT oluşumun mekanizmaları arasında olabileceğini düşünmekteyiz. TLR2 ve TLR4 sinyalizasyon hedefli tedaviler, devam eden inflamatuvar döngüyü kırabilir ve otoimmün hastalıkları iyileştirebilir. Ancak, TLR2 ve TLR4'ün otoimmün hastalıklarla olan etkileşiminin sonucunda oluşan mekanizmalar belirsizliğini koruyor; bu nedenle bu doğrultuda konu ile ilgili çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi-Roodsaz S, Joosten L A, Helsen M M, Walgreen B, van Lent P L, van den Bersselaar L A and van den Berg W B** (2008) Shift from toll-like receptor 2 (TLR-2) toward TLR-4 dependency in the erosive stage of chronic streptococcal cell wall arthritis coincident with TLR-4-mediated interleukin-17 production. *Arthritis & Rheumatology*, 58 (12): 3753-3764.
- Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA** (2010) 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467 (7319): 1061-1073.
- Agnese D M, Calvano J E, Hahm S J, Coyle S M, Corbett S A, Calvano S E and Lowry S F** (2002). Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *The Journal of infectious diseases*, 186 (10): 1522-1525.
- Ajjan R A, and Weetman A P** (2015) The pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis: further developments in our understanding. *Hormone and Metabolic Research*, 47 (10): 702-710.
- Akamizu T, Amino N and DeGroot L J** (2013) Hashimoto's thyroiditis.
- Akamizu T, Amino N, DeGroot L J** (2012) Hashimoto's thyroiditis. In: *Thyroid Disease Manager* (<http://www.thyroidmanager.org/chapter/hashimotos-thyroiditis/>)
- Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead M Aand Beyaert R** (2012) The p110 [delta] isoform of the kinase PI (3) K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nature immunology*, 13 (11): 1045-1054.
- Aliprantis A O, Yang R B, Mark M R, Suggett S, Devaux B, Radolf J D and Zychlinsky A** (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285 (5428): 736-739.
- Aliprantis A O, Yang R B, Weiss D S, Godowski P and Zychlinsky A** (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *The EMBO journal*, 19 (13): 3325-3336.
- Allen E M, Appel M C and Braverman, L E** (1986) The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the diabetes-prone BB/W rat. *Endocrinology*, 118 (5): 1977-1981.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Andrade C F, Waddell T K, Keshavjee S and Liu M** (2005) Innate Immunity and Organ Transplantation: The Potential Role of Toll-like Receptors. *American journal of transplantation*, 5 (5): 969-975.
- Antonelli A, Ferrari S M, Corrado A, Di Domenicantonio A, and Fallahi P** (2015) Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity Reviews*, 14 (2): 174-180.
- Arbour N C, Lorenz E, Schutte B C, Zabner J, Kline J N, Jones M and Schwartz D A** (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, 25 (2).
- Ashkenazi A and Dixit V M** (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281 (5381): 1305-1308.
- Bacanli A, Sallakci N, Yavuzer U, Alpsoy E ve Yegin O** (2006) Toll-like receptor 2 Arg753Gln gene polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *Clinical and Experimental Dermatology*, 31 (5): 699-701.
- Badenhoop K, Schwarz G, Walfish P G, Drummond V, Usadel K H and Bottazzo G F** (1990) Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 71 (5): 1131-1137.
- Bae Y S, Lee J H, Choi S H, Kim S, Almazan F, Witztum J L and Miller Y I** (2009) Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized LDL: TLR4-and Syk-dependent activation of Nox2. *Circulation Research*, 104 (2): 210.
- Baker Jr J R** (1999) Dying (apoptosing?) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (8): 2593-2595.
- Barber R C, Aragaki C C, Rivera-Chavez F A, Purdue G F, Hunt J L and Horton J W** (2004) TLR4 and TNF- α polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *Journal of Medical Genetics*, 41 (11): 808-813.
- Barber R C, Chang L Y E, Arnoldo B D, Purdue G F, Hunt J L, Horton J W and Aragaki C C** (2006) Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clinical Medicine & Research*, 4 (4): 250-255.
- Barin J G, Talor M V, Sharma R B, Rose N R and Burek C L** (2005) Iodination of murine thyroglobulin enhances autoimmune reactivity in the NOD. H2h4 mouse. *Clinical & Experimental Immunology*, 142 (2): 251-259.
- Barton G M and Medzhitov R** (2002) Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 14 (3): 380-383.
- Becker, K L (Ed.)** (2001) *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins. 456-458.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Berdeli A, Celik H A, Özyürek R, Dogrusoz B and Aydin H H** (2005) TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *Journal of Molecular Medicine*, 83 (7): 535-541.
- Berdeli A, Emingil G, Han Saygan B, Gürkan A, Atilla G, Köse T and Baylas H** (2007) TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *Journal of Clinical Periodontology*, 34 (7): 551-557.
- Bielinski S J, Hall J L, Pankow J S, Boerwinkle E, Matijevic-Aleksic N, He M and Folsom A R** (2011) Genetic variants in TLR2 and TLR4 are associated with markers of monocyte activation: the Atherosclerosis Risk in Communities MRI Study. *Human Genetics*, 129 (6): 655-662.
- Bjergved L, Jørgensen T, Perrild H, Carlé A, Cerqueira C, Krejbjerg A, and Knudsen N** (2012) Predictors of change in serum TSH after iodine fortification: an 11-year follow-up to the DanThyr study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97 (11): 4022-4029.
- Bochud P Y, Hawn T R and Aderem A** (2003) Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *The Journal of Immunology*, 170 (7): 3451-3454.
- Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P and Ghinai A** (2009) Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clinical & Experimental Rheumatology*, 27 (1): S40.
- Bossowski A, Moniuszko M, Dąbrowska M, Mrugacz M, Sawicka B, and Bossowska A** (2011) Analysis of T regulatory cells in the peripheral blood in children and adolescents with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Endokrynologia Pediatria*, 34 (1): 37-48.
- Boukis M A, Koutras D A, Souvatzoglou A, Evangelopoulou A, Vrontakis M, and Mouloupoulos S D** (1983) Thyroid hormone and immunological studies in endemic goiter. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 57 (4): 859-862.
- Boule M W, Broughton, C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A and Rifkin I R** (2004) Toll-like receptor 9-dependent and-independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *Journal of Experimental Medicine*, 199 (12): 1631-1640.
- Bretz J D and Baker J R** (2001) Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction?. *Clinical Endocrinology*, 55 (1): 1-11.
- Brix T H, Kyvik K O and Hegedüs L** (2000) A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85 (2): 536-539.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Brown J, Wang H, Hajishengallis G N and Martin M** (2011) TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research*, 90(4), 417-427.
- Brown R S** (2009) Autoimmune thyroid disease: unlocking a complex puzzle. *Current Opinion in Pediatrics*, 21(4), 523-528.
- Bustamante M F, Fissolo N, Río J, Espejo C, Costa C, Mansilla M J and Comabella M** (2011) Implication of the toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon- β in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(4), 634-645.
- Cao Z, Henzel W J and Gao X** (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, 271(5252), 1128.
- Carayanniotis G** (2011) Molecular parameters linking thyroglobulin iodination with autoimmune thyroiditis. *Hormones (Athens)*, 10(1), 27-35.
- Carlé A, Laurberg P, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen L B and Pedersen I B** (2006) Thyroid peroxidase and thyroglobulin auto-antibodies in patients with newly diagnosed overt hypothyroidism. *Autoimmunity*, 39(6), 497-503.
- Carrasco S, Neves F S, Fonseca M H, Gonçalves C R, Saad C G, Sampaio-Barros P D and Goldenstein-Schainberg C** (2011) Toll-like receptor (TLR) 2 is upregulated on peripheral blood monocytes of patients with psoriatic arthritis: a role for a gram-positive inflammatory trigger?. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*, 29(6), 958.
- Castiblanco J, Varela D C, Castaño-Rodríguez N, Rojas-Villarraga A, Hincapié M E and Anaya J M** (2008) TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 541-544.
- Caturegli P, De Remigis A and Rose N R** (2014) Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews*, 13(4), 391-397.
- Champion B R, Page K R, Parish N, Rayner D C, Dawe K, Biswas-Hughes G and Roitt I M** (1991) Identification of a thyroxine-containing self-epitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 174(2), 363-370.
- Chen C R, Hamidi S, Braley-Mullen H, Nagayama Y, Bresee C, Aliesky H A and McLachlan S M** (2010) Antibodies to thyroid peroxidase arise spontaneously with age in NOD. H-2h4 mice and appear after thyroglobulin antibodies. *Endocrinology*, 151(9), 4583-4593.
- Chen Z J** (2005) Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nature cell biology*, 7(8), 758-765.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chistiakov D A** (2005) Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Autoimmune Diseases*, 2(1), 1.
- Chovanova L, Vlcek M, Krskova K, Penesova A, Radikova Z, Rovensky J and Imrich R** (2013) Increased production of IL-6 and IL-17 in lipopolysaccharide-stimulated peripheral mononuclears from patients with rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys*, 32(3), 395-404.
- Cole J E, Georgiou E and Monaco C** (2010) The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2010.
- Cooper D S, Greenspan F S and Ladenson P** (2009) Greenspan's temel ve klinik endokrinoloji. Arslan M. (Çeviri editörü). Güneş Tıp Kitabevleri. (sekizinci baskı). Sayfa 264-266.
- Coşan F, Oku B, Çakiris A, Duymaz-Tozkir J, Mercanoğlu F, Saruhan-Direskeneli G and Gül A** (2009) No association of the TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with rheumatic heart disease and Behçet's disease. *Clinical Rheumatology*, 28(12), 1385.
- Dayan C M and Daniels G H** (1996) Chronic autoimmune thyroiditis. *New England Journal of Medicine*, 335(2), 99-107.
- De Nardo D** (2015) Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74(2), 181-189.
- Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S and e Sousa C R** (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529-1531.
- Drexhage H A, Bottazzo G F, Bitensky L, Chayen J and Doniach D** (1981) Thyroid growth-blocking antibodies in primary myxoedema. *Nature*, 289(5798), 594-596.
- Duntas L H** (2008). Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nature Clinical Practice Endocrinology & metabolism*, 4(8), 454-460.
- Ebner S A, Lueprasitsakul W, Alex S, Fang S L, Appel, M C and Braverman L E** (1992) Iodine content of rat thyroglobulin affects its antigenicity in inducing lymphocytic thyroiditis in the BB/Wor rat. *Autoimmunity*, 13(3), 209-214.
- Ehlers M, Thiel A, Bernecker C, Porwol D, Papewalis C, Willenberg H S and Schott M** (2012) Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(4), 1347-1354.
- Eizadora T Y and Hadi M Z** (2011) Bioinformatic processing to identify single nucleotide polymorphism that potentially affect Apel function. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(2), 140-146.
- En P** (2003) Farwell Ap, Braverman LE: Thyroiditis. *N Engl J Med*, 348, 2646-54.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Estruch M, Bancells C, Beloki L, Sanchez-Quesada J L, Ordóñez-Llanos J and Benitez S** (2013) CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis*, 229(2), 356-362.
- Farid N R, Sampson L, Moens H and Barnard J M** (1981) The Association of Goitrous Autoimmune Thyroiditis with HLA-DR5. *HLA*, 17(3), 265-268.
- Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg B J, Netea M G and Adema G J** (2008) Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular Microbiology*, 10(10), 2058-2066.
- Figuroa-Vega, N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R and Marazuela M** (2010) Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 953-962.
- Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer J M, Meroni P L and Chizzolini C** (2008) Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis & Rheumatology*, 58(12), 3913-3923.
- Fisher DA and Grueters A** (2008) Thyroid disorders in childhood and adolescence. In *Pediatric Endocrinology (Third Edition)* (pp. 227-253).
- Garcia-Rodríguez S, Arias-Santiago S, Perandrés-López R, Castellote L, Zumaquero E, Navarro P and Zubiaur M** (2013) Increased gene expression of Toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 27(2), 242-250.
- Gay N J and Keith F J** (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351, 355-356.
- Gharahkhani P, O'Leary C A, Kyaw-Tanner M, Sturm R A and Duffy D L** (2011) A non-synonymous mutation in the canine Pkd1 gene is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease in Bull Terriers. *PloS one*, 6(7), e22455.
- Ghosh S, May M J and Kopp E B** (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 225-260.
- Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G and Galluzzo A** (1997) Potential Involvement of Fas and Its Ligand in the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *Science*, 275(5302), 960-963.
- Gohda J, Matsumura T and Inoue J I** (2004) Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- β (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2913-2917.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gorden K B, Gorski K S, Gibson S J, Kedl R M, Kieper W C, Qiu X and Vasilakos J P** (2005) Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *The Journal of Immunology*, 174(3), 1259-1268.
- Guo H, Peng D, Yang X G, Wang Y, Xu B C, Ni J S and Jiang Y F** (2014) A higher frequency of circulating IL-22+ CD4+ T cells in Chinese patients with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis. *PLoS One*, 9(1), e84545.
- Günther T and Schmid K J** (2010) Deleterious amino acid polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* and rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(1), 157-168.
- Hasham A and Tomer Y** (2012) Genetic and epigenetic mechanisms in thyroid autoimmunity. *Immunologic Research*, 54(1-3), 204-213.
- Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Eugene C Y, Goodlett D R and Aderem A** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- He X, Jing Z and Cheng G** (2014) MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*, 2014.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S and Bauer S** (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), 1526-1529.
- Hemmi, H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H and Akira S** (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740-745.
- Hoffmann J A** (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426(6962), 33-38
- Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi N, Katsuyama Y, Takemoto Y and Lee E B** (2009) Association of TLR4 polymorphisms with Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology*, 48(6), 638-642.
- Hornef M W, Normark B H, Vandewalle A and Normark S** (2003) Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 198(8), 1225-1235.
- Hou Y, Lin H, Zhu L, Liu Z, Hu F, Shi J and Wang Q** (2013) Lipopolysaccharide Increases the Incidence of Collagen-Induced Arthritis in Mice Through Induction of Protease HTRA-1 Expression. *Arthritis & Rheumatology*, 65(11), 2835-2846.
- Hu J and Ng P C** (2012) Predicting the effects of frameshifting indels. *Genome Biology*, 13(2), R9.
- Hutfless S, Matos P, Talor, M. V, Caturegli, P and Rose N R** (2011) Significance of prediagnostic thyroid antibodies in women with autoimmune thyroid disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(9), E1466-E1471.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Inoue N, Watanabe M, Katsumata Y, Ishido N, Hidaka Y and Iwatani Y** (2015) Association between functional polymorphisms in the toll-like receptor 4 (TLR4) gene and HD severity. *HLA*, 85(3), 209-211.
- Jacobson D L, Gange S J, Rose N R, and Graham N M** (1997) Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84(3), 223-243.
- Janardhanan J, Martin S J, Astrup E, Veeramanikandan R, Aukrust P, Abraham O C, and Varghese G M** (2013) Single-nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor (TLR)-2, TLR4 and heat shock protein 70 genes and susceptibility to scrub typhus. *Journal of Human Genetics*, 58(11), 707-710.
- Jenkins D, Penny M A, Fletcher J A, Jacobs K H, Mijovic C H, Franklyn J A and Sheppard M C** (1992) HLA class II gene polymorphism contributes little to Hashimoto's thyroiditis. *Clinical Endocrinology*, 37(2), 141-145.
- Joosten L A, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello C A, O'Neill L and Netea M G** (2016) Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(6), 344-357.
- Kaczmarek E, Lacka K, Jarmolowska-Jurczyszyn D, Sidor A and Majewski P** (2011) Changes of B and T lymphocytes and selected apoptosis markers in Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Pathology*, jcp-2010.
- Kaisho T and Akira S** (2006) Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5), 979-987.
- Kang S S, Kauls L S and Gaspari A A** (2006) Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(6), 951-983.
- Kang T J, Yeum C E, Kim B C, You E Y and Chae G T** (2004) Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology*, 112(4), 674-680.
- Karaca N, Ozturk G, Gerceker B T, Turkmen M and Berdeli A** (2013) TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Turkish vitiligo patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 27(1).
- Kawai T and Akira S** (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.
- Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Fujikawa K and Kamachi M** (2007) Toll-like receptor in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: functional analysis by human salivary gland cell line. *The Journal of Rheumatology*, 34(5), 1019-1026.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Khan A U H, Aslam M A, Hussain I, Naz A G, Rana I A, Ahmad M M and Ahmad S** (2014) Role of Toll-like receptor 2 (-196 to-174) polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis in Pakistani population. *International Journal of Immunogenetics*, 41(2), 105-111.
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann C J, Oberhollenzer F, Bonora, E and Schwartz D A** (2002) Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *New England Journal of Medicine*, 347(3), 185-192.
- Kirchner M, Sonnenschein A, Schoofs S, Schmidtke P, Umlauf V N and Mannhardt-Laakmann W** (2013) Surface expression and genotypes of Toll-like receptors 2 and 4 in patients with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatric Rheumatology*, 11(1), 9.
- Kolz M, Baumert J, Müller M, Khuseyinova N, Klopp N, Thorand B, Meisinger C, Herder C, Koenig W and Illig T** (2008) Association between variations in the *TLR4* gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL cholesterol. *BMC Med Gene*, 25;9:9.
- Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, Ozawa M, Togashi M, Masai R and Sawada K** (2008) Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical & Experimental Immunology*, 152(3), 482-487.
- Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H and Ohtaki S** (1995) Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*, 20(4), 231-236.
- La Franchi S** (2008) Disorders of thyroid gland. *Nelson textbook of pediatrics. 18th. ed. Elsevier: Saunders*, 2327-8.
- LaFranchi S** (2004) Disorders of the thyroid gland/thyroiditis. *Nelson Textbook of Pediatrics* (17th edition) Eds, Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. W.B.Saunders Company, 1870-1890.
- Lam H Y, Clark M J, Chen R, Chen R, Natsoulis G, O'hualachain M, and Butte A J** (2012) Performance comparison of whole-genome sequencing platforms. *Nature Biotechnology*, 30(1), 78-82.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald K A, Monks B G, Knetter C F and Golenbock D T** (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5(2), 190-198.
- Lee B L, Moon J E, Shu J H, Yuan L, Newman Z R, Schekman R and Barton G M** (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife*, 2, e00291.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Lee M S, Kim D H, Lee J C, Kim S and Kim H S** (2011) Role of TLR2 in the pathogenesis of autoimmune diabetes and its therapeutic implication. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27(8), 797-801.
- Lee Y H, Bae S C, Kim J H and Song G G** (2014) Toll-like receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology International*, 34(1), 111-116.
- Li J, Wang X, Zhang F and Yin H** (2013) Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(3), 441-451.
- Lien E and Zipris D** (2009) The role of Toll-like receptor pathways in the mechanism of type 1 diabetes. *Current Molecular Medicine*, 9(1), 52-68.
- Liu R, Mo Y Y, Wang H L, Tan Y, Wen X J, Deng M J and Li L** (2016) The relationship between toll like receptor 4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms and sepsis susceptibility: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 6.
- Liu Y, Yin H, Zhao M and Lu Q** (2014) TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 47(2), 136-147.
- Lorenz E, Mira J P, Cornish K L, Arbour N C and Schwartz D A** (2000) A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infection and Immunity*, 68(11), 6398-6401.
- Lorenz E, Mira J P, Frees K L and Schwartz D A** (2002) Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Archives of Internal Medicine*, 162(9), 1028-1032.
- Lorenz W, Buhrmann C, Mobasheri A, Lueders C and Shakibaei M** (2013) Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), R111.
- Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W and Luger T A** (2010) The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nature Medicine*, 16(6), 713-717.
- Mandal R K, George G P and Mittal R D** (2012) Association of Toll-like receptor (TLR) 2, 3 and 9 genes polymorphism with prostate cancer risk in North Indian population. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7263-7269.
- Marique L, Van Regemorter V, Gérard A C, Craps J, Senou M, Marbaix E and Colin I M** (2014) The expression of dual oxidase, thyroid peroxidase, and caveolin-1 differs according to the type of immune response (TH1/TH2) involved in thyroid autoimmune disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), 1722-1732.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y and Seya T** (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 171(6), 3154-3162.
- McInturff J E, Modlin R L and Kim J** (2005) The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 1-8.
- McLachlan S M and Rapoport B** (2004) Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies?. *Thyroid*, 14(7), 510-520.
- McLeod D S and Cooper D S** (2012) The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine*, 42(2), 252-265.
- Means T K, Latz E, Hayashi F, Murali M R, Golenbock D T and Luster A D** (2005) Human lupus autoantibody–DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 407.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway C A** (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Menconi F, Monti M C, Greenberg D A, Oashi T, Osman R, Davies T F and Tomer Y** (2008) Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 14034-14039.
- Merx S, Neumaier M, Wagner H, Kirschning C J and Ahmad-Nejad P** (2007) Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. *Human Molecular Genetics*, 16(10), 1225-1232.
- Morohoshi K, Takahashi Y and Mori K** (2011) Viral infection and innate pattern recognition receptors in induction of Hashimoto's thyroiditis. *Discovery Medicine*, 12(67), 505-511.
- Mukhopadhyay S, Herre J, Brown G D and Gordon S** (2004) The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology*, 112(4), 521-530.
- Muzio M, Ni J, Feng P and Dixit V M** (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615.
- Ng S B, Turner E H, Robertson P D, Flygare S D, Bigham A W, Lee C and Bamshad M** (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461(7261), 272-276.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M and Arinami T** (2004) An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(2), 177-183
- Noppert S J, Fitzgerald K A and Hertzog P J** (2007) The role of type I interferons in TLR responses. *Immunology and Cell Biology*, 85(6), 446-457.
- Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K and Shimizu T** (2012) Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40611-40617.
- Okamura Y, Watari M, Jerud E S, Young D W, Ishizaka S T, Rose J and Strauss J F** (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10229-10233.
- O'Neill L A** (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological Reviews*, 226(1), 10-18.
- O'Neill L A, Golenbock D and Bowie A G** (2013) The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 453-460.
- Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling, C, Tak P P and Kyburz D** (2008) Overexpression of toll like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 58(12), 3684-3692.
- Ozen S, Berdeli A, Türel B, Kutlay S, Yalcinkaya F, Arici M and Yilmaz E** (2006) Arg753Gln TLR-2 polymorphism in familial mediterranean fever: linking the environment to the phenotype in a monogenic inflammatory disease. *The Journal of Rheumatology*, 33(12), 2498-2500.
- Özata M** (2011) Endokrinoloji, Metabolizma ve Diyabet. (2. Baskı). İstanbul: İstanbulTıp Kitabevi Yayıncılık.
- Pandit A A, Vijay Warde M and Menon P S** (2003) Correlation of number of intrathyroid lymphocytes with antimicrobial antibody titer in Hashimoto's thyroiditis. *Diagnostic Cytopathology*, 28(2), 63-65.
- Pasare C and Medzhitov R** (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1382-1387.
- Petry V and Gaspari A A** (2009) Toll-like receptors and dermatology. *International Journal of Dermatology*, 48(6), 558-570.
- Piccinini A M and Midwood K S** (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Qin Q, Liu P, Liu L, Wang R, Yan N, Yang J and Zhang J A** (2012) The increased but non-predominant expression of Th17-and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), 1202-1208.
- Radstake T R, Roelofs M F, Jenniskens Y M, Oppers-Walgreen B, van Riel P L, Barrera P and van den Berg W B** (2004) Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . *Arthritis & Rheumatology*, 50(12), 3856-3865.
- Rasooly L, Rose N R, Saboori A M, Ladenson P W and Burek C L** (1998) Iodine is essential for human T cell recognition of human thyroglobulin. *Autoimmunity*, 27(4), 213-219.
- Roach J C, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell M K, Smith K D and Aderem A** (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9577-9582.
- Roeder A, Kirschning C J, Rupec R A, Schaller M and Korting H C** (2004) Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends in Microbiology*, 12(1), 44-49.
- Rosa R S and Ravi K D M** (2012) Toll-like receptors and diabetes complications: recent advances. *Current Diabetes Reviews*, 8(6), 480-488.
- Rose N R** (2007) Autoimmune escalation: through the crystal ball. *Clin Exp Immunol*, 147, 9.
- Ruwhof C and Drexhage H A** (2001) Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid*, 11(5), 427-436.
- Sadanaga A, Nakashima H, Akahoshi M, Masutani K, Miyake K, Igawa T, and Harada M** (2007) Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/lpr mice. *Arthritis & Rheumatology*, 56(5), 1618-1628.
- Sandor F and Buc M** (2005) Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biologica*, 51(5), 148.
- Saranac L, Zivanovic S, Bjelakovic B, Stamenkovic H, Novak M, and Kamenov B** (2011) Why is the thyroid so prone to autoimmune disease?. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(3), 157-165.
- Schürmann M, Kwiatkowski R, Albrecht M, Fischer A, Hampe J, Müller-Quernheim J, Schwinger E and Schreiber S** (2008) Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 152(3):423-31.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Sebro R, Levy H, Schneck K, Dimmock D, Raby B A, Cannon C L and Risch N J** (2012) Cystic fibrosis mutations for p. F508del compound heterozygotes predict sweat chloride levels and pancreatic sufficiency. *Clinical Genetics*, 82(6), 546-551.
- Shaw P J, Barr M J, Lukens J R, McGargill M A, Chi H, Mak T W and Kanneganti T D** (2011) Signaling via the RIP2 adaptor protein in central nervous system-infiltrating dendritic cells promotes inflammation and autoimmunity. *Immunity*, 34(1), 75-84.
- Shen X, Shi R, Zhang H, Li K, Zhao Y and Zhang R** (2010) The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion*, 81(2), 69.
- Sherry S T, Ward M H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski E M and Sirotkin K** (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 308-311.
- Shi G, Wang T, Li S, Cheng Y, Sheng P, Fan Y and Zhu K** (2016) TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese Psoriasis Vulgaris patients. *Journal of Dermatological Science*, 83(2), 145-147.
- Sinclair D** (2008) Analytical aspects of thyroid antibodies estimation. *Autoimmunity*, 41(1), 46-54.
- Slatosky J, Shipton B and Wahba H** (2000) Thyroiditis: differential diagnosis and management. *American Family Physician*, 61(4), 1047-52.
- Smiley S T, King J A and Hancock W W** (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167(5), 2887-2894.
- Smirnova I, Poltorak A, Chan E K, McBride C and Beutler B** (2000) Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biology*, 1(1), research002-1.
- Smits B M, van Zutphen B F, Plasterk R H and Cuppen E** (2004) Genetic variation in coding regions between and within commonly used inbred rat strains. *Genome Research*, 14(7), 1285-1290.
- Spachidou M P, Bourazopoulou E, Maratheftis C I, Kapsogeorgou E K, Moutsopoulos H M, Tzioufas A G and Manoussakis M N** (2007) Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinical & Experimental Immunology*, 147(3), 497-503.
- Stefan M, Jacobson E M, Huber A K, Greenberg D A, Li C W, Skrabanek L and Tomer Y** (2011) Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic interferon α -modulated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31168-31179.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Stenson P D, Mort M, Ball E V, Howells K, Phillips A D, Thomas N S and Cooper D N** (2009) The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Medicine*, 1(1), 13.
- Tabel Y, Berdeli A and Mir S** (2007) Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *International Journal of Immunogenetics*, 34(6), 399-405.
- Taguchi T, Mitcham J L, Dower S K, Sims J E and Testa J R** (1996) Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* Transmembrane receptor toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, 32(3), 486-488.
- Takami H E, Miyabe R and Kameyama K** (2008) Hashimoto's thyroiditis. *World Journal of Surgery*, 32(5), 688-692.
- Takeda K and Akira S** (2004) TLR signaling pathways. In *Seminars in Immunology* (Vol. 16, No. 1, pp. 3-9). Academic Press.
- Takeda K and Akira S** (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1-14.
- Takeda K, Kaisho T and Akira S** (2003) Toll-like receptors. *Annual review of Immunology*, 21(1), 335-376.
- Takeuchi O and Akira S** (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T and Akira S** (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4), 443-451.
- Tang C H, Hsu C J, Yang W H and Fong Y C** (2010) Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKC δ and c-Src dependent pathways. *Biochemical Pharmacology*, 79(11), 1648-1657.
- Taylor K R, Yamasaki K, Radek K A, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D and Gallo R L** (2007) Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18265-18275.
- Teng X, Shan Z, Chen Y, Lai Y, Yu J, Shan L, and Wang S** (2011) More than adequate iodine intake may increase subclinical hypothyroidism and autoimmune thyroiditis: a cross-sectional study based on two Chinese communities with different iodine intake levels. *European Journal of Endocrinology*, 164(6), 943-950.
- Teng W, Shan Z, Teng X, Guan H, Li Y, Teng D and Yang F** (2006) Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *New England Journal of Medicine*, 354(26), 2783-2793.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Till B J, Reynolds S H, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K and Greene E A** (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by Tilling. *BMC Plant Biology*, 4(1), 12.
- Tomer Y** (2010) Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid*, 20(7), 715-725.
- Trinchieri G and Sher A** (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*, 7(3), 179-190.
- Tunbridge W M G, Evered D C, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F and Smith P A** (1977) The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clinical Endocrinology*, 7(6), 481-493.
- Tunbridge W M G and Vanderpump M P** (2000) Population screening for autoimmune thyroid disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 29(2), 239-253.
- Uematsu S and Akira S** (2007) Toll-like receptors and Type I interferons. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15319-15323.
- Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R and Martínez A** (2007) TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *Journal of Neuroimmunology*, 192(1), 215-218.
- URL-1** < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR2&keywords=tlr2> >, Ziyaret tarihi: 28.09.2017.
- URL-2** < <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR4&keywords=tlr4> >, Ziyaret tarihi: 28.09.2017.
- URL-3** < SIFT Database: http://siftdna.org/www/SIFT_dbSNP.html >, Ziyaret tarihi: 14.11.2017
- Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning C J, Häcker H and Wagner H** (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31332-31339.
- Van Bon L, Popa C, Huijbens R, Vonk M, York M, Simms R, and Radstake T R D J** (2010) Distinct evolution of TLR-mediated dendritic cell cytokine secretion in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Annrheumdis128207.
- Van der Graaf C, Kullberg B J, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer J W and Netea M G** (2005) Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine*, 30(5), 264-268.

KAYNAKLAR (devam ediyör)

- Vanderpump M P J, Tunbrldge W M G, French J, Appleton D, BatesD, Clark F, and Young E T** (1995) The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clinical Endocrinology*, 43(1), 55-68
- Von Aulock S, Schröder N W, Gueinzius K, Traub S, Hoffmann S, Graf K and Hermann C** (2003) Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(6), 938-943.
- Walsh J P, Bremner A P, Feddema P, Leedman P J, Brown S J and O'leary P** (2010) Thyrotropin and thyroid antibodies as predictors of hypothyroidism: a 13-year, longitudinal study of a community-based cohort using current immunoassay techniques. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(3), 1095-1104.
- Wang C, and Crapo L M** (1997) The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 26(1), 189-218.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju G R, Inoue J I and Chen Z J** (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412(6844), 346-351.
- Wang L L, Yang A K, Li Y, Liu J P and Zhou S F** (2010) Phenotype prediction of deleterious nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human alcohol metabolism-related genes: a bioinformatics study. *Alcohol*, 44(5), 425-438.
- Watanabe M, Yamamoto N, Maruoka H, Tamai H, Matsuzuka F, Miyauchi A and Iwatani Y** (2002) Independent involvement of CD8+ CD25+ cells and thyroid autoantibodies in disease severity of Hashimoto's disease. *Thyroid*, 12(9), 801-808.
- Weetman A P** (2003) Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *European Journal of Endocrinology*, 148(1), 1-9.
- Weetman A P** (2004) Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology*, 61(4), 405-413.
- Weetman A P and McGregor A M** (1994) Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine Reviews*, 15(6), 788-830.
- Woolner L B, McConahey W M and Beahrs O H** (1959) Struma lymphomatosa (Hashimoto's thyroiditis) and related thyroidal disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(1), 53-83.
- Xiao W H, Hong T P, Wang H N, Liu G Q, Liu Z and Wang Y R** (2008) Thyrocytes contribute to their own demise: the role of interleukin-18 in Hashimoto's thyroiditis. *Zhonghua yi xue za zhi*, 88(40), 2817-2820.
- Xu D, Komai-Koma M and Liew F Y** (2005) Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cellular Immunology*, 233(2), 85-89.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Xu D, Liu H and Komai-Koma M** (2004) Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*, 1(4), 239-246.
- Xu W D, Liu S S, Pan H F and Ye D Q** (2012) Lack of association of TLR4 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine*, 79(6), 566-569.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H and Akira S** (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640-643.
- Yu J T, Mou S M, Wang L Z, Mao C X and Tan L** (2011) Toll-like receptor 2-196 to-174 del polymorphism influences the susceptibility of Han Chinese people to Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 136.
- Yu L, Wang L and Chen S** (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2592-2603.
- Zhang D, Zhang G, Hayden M S, Greenblatt M B, Bussey C, Flavell R A and Ghosh S** (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663), 1522-1526.
- Zhang J A, Zhang J, Xu L, Mar H and Wu X Y** (2006) Measurement of IL-12 and IL-18 in sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi Chinese journal of Cellular and Molecular Immunology*, 22(5), 630-632.

EK AÇIKLAMALAR A

EK A: Etik Kurul Karar Formu



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

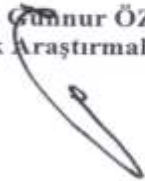
TOPLANTI TARİHİ : 26/05/2015
TOPLANTI NO : 2015/03

KARARLAR :

- 1- B.E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2015-23-26/05 Protokol no'lu "Hashimoto Tiroiditi ile Toll Like Reseptör 2 (TLR2) ve Toll Like Reseptör 4 (TLR4) Arasındaki İlişkinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç. Dr. 
B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



ÖZGEÇMİŞ

Tuğba AKTAŞ 08.11.1975 tarihinde Zonguldak'ta dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Gazi İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Fener Lisesinde başarıyla tamamladı. Lisans eğitimini 1994-1998 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 1999 yılından beri BEÜ Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2004 yılından itibaren de Tıbbi Genetik Laboratuvarında çalışmaktadır. Lisansüstü eğitimine Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında devam etmektedir.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres:

Bülent Ecevit Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi (Yeni Eğitim Bloğu),
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı
İncivez/ ZONGULDAK

Tel: (+90) 372 291 11 00

E-posta: tgbaktas@gmail.com