

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK
PURPURA HASTALIĞI ÖZELİNDE
OTOİMMÜN HASTALIKLARDA B LENFOSİT
AKTİVASYON FAKTÖRÜN (BAFF) ROLÜ**

**Gürkan BAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2006**

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA
HASTALIĞI ÖZNELİNDE OTOİMMÜN
HASTALIKLARDA B LENFOSİT
AKTİVASYON FAKTÖRÜN (BAFF) ROLÜ

Gürkan BAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Tülay HEKİMBAŞI

GEBZE
2006

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: İdiyopatik Trombositopenik Purpura Hastalığı Öznelinde Otoimmün Hastalıklarda B Lenfosit Aktivasyon Faktörün (BAFF) Rolü

YAZAR ADI: Gürkan BAL

İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP), trombositlerin spesifik otoantikorlar tarafından kaplanıp, rediküloendotelyal sistem tarafından yıkıldığı otoimmün bir hastalıktır. Periferik Trombosit sayısının düşmesinin göreceli etkisi, hastalar üzerinde artmış kanama riski olarak gözlemlenir. B lenfosit aktivasyon faktör (BAFF); tümör Nekrozan faktör ailesinin bir üyesi olup, B lenfosit gelişiminin önemli bir düzenleyicisidir.

İTP hastalığında BAFF proteininin rolünü açıklayabilmek için, 90 farklı hastadan farklı zaman ve tedavi protokolleri altında 175 kan örneği alınıp, ELISA yöntemi ile serum BAFF düzeyleri tespit edildi. Hastalar, prednisolon ile tedavidekiler, remisyon fazındakiler ve aktif İTP hastaları olarak sınıflandırıldı. Aktif İTP hasta grubunda; serum BAFF düzeyinin (1221 pg/ml medyan) sağlıklı kontrol grubuna (941 pg/ml medyan) göre istatistiksel anlamlılık taşıyacak şekilde arttığı belirlendi ($p < 0,05$). Kortikosteroid tedavi altındaki hasta grubunda ise; serum BAFF düzeyinin normale döndüğü gözlemlendi (660 pg/ml medyan). Bu değer kontrol grubundan istatistiksel anlamlılık dahilinde ayrılmaktadır. Remisyon safhasındaki İTP hasta grubunda (875 pg/ml) serum BAFF düzeyi kontrolden farklı bulunamadı ($p > 0,05$).

Bu çalışma ile; artan serum BAFF seviyesinin, hematolojik bir hastalığın özelliği olduğu ilk defa ortaya kondu. Ayrıca, BAFF promotor DNA dizisi üzerinde, ikisi bu çalışma ile yeni tanımlanmış olan, üç farklı tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edildi. Bu SNP'lerden iki tanesinin, BAFF promotor üzerinde olası transkripsiyon faktör bağlanma noktası oluşturabileceği ilk defa bu çalışma ile gösterildi.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: The Role of B Lymphocyte Activating Factor (BAFF) in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) as an Autoimmune Disorder

AUTHOR: Gürkan BAL

Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) is an autoimmune disorder in which platelets are opsonized by specific antibodies and destroyed by the reticuloendothelial system (RES). As an outcome of this disorder, a peripheral thrombocyte count in affected individuals appears to be lower, leading to enhanced risk of bleeding. B cell activating factor (BAFF) is a member of the tumor necrosis factor family and an important regulator of B cell development. Elevated BAFF serum levels have been linked to several autoimmune diseases such as Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus.

To clarify a possible role of BAFF in ITP; 175 blood samples from 90 patients with ITP were taken and classified into three groups (active ITP patients, ITP patients in remission and ITP patients under Prednisolone treatment). BAFF serum levels were detected to be increased in active ITP group (median 1221 pg/ml) compared to healthy control individuals (median 941 pg/ml). Treatment with Corticosteroids was found to be associated with normalized BAFF levels (median 660 pg/ml). In remission ITP group (median 875 pg/ml), no significant difference was observed in comparison with control group, herein.

It was stated as the first time in this study that elevated BAFF expression appears to be a feature of this hematological disease. Moreover, five mutations were identified on the BAFF promoter, two of which being reported for the first time, herein. It was shown that two of these SNP's possibly create transcription factor binding sites on the BAFF promoter.

TEŞEKKÜR

Çalışmada danışmanlığımı üstlenen, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay Hekimbaşı'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının tüm aşamaları Berlin Charite Tıp Üniversitesi Transfüzyon Enstitüsü tarafından finanse edilmiştir. Gerek projenin finansmanında gösterdiği kolaylıklar, gerekse yönlendirmeleri nedeniyle, Enstitü Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdulgabar Salama'ya teşekkürlerimi sunarım.

Transfüzyon Enstitüsü HLA Laboratuvarı sorumlusu Dr. Constanse Schönemann ve Teknisyen Caroline Mühle'e, DNA Laboratuar sorumlusu Dr. Florian Emmerich ve Trombosit Laboratuvarı sorumlusu Dr. Oliver Meyer'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında eşsiz yardımlarından dolayı, arkadaşım ve meslektaşım Biyoteknolog Julian Milz'e teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve karşılaştığım güçlüklerde yardımcı olan babam, kardeşlerim, dost ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. İmmün Cevap Kavramı	1
1.2. Hipersensivite ve Otoimmünite Kavramları	2
1.3. Doku Hasarını Oluşturan Efektör Mekanizmalar	4
1.3.1. Antikor Aracılık Ettiği Efektör Mekanizmalar	4
1.3.1.1. Sitotoksik Hipersensivite	4
1.3.1.2. İmmün Kompleks Aracılıklı Hipersensivite	5
1.3.2. T-Lenfosit Aracılıklı Efektör Mekanizmalar	9
1.3.2.1. Gecikmiş Tip Hipersensivite Reaksiyonu	10
1.3.2.2. Sitotoksik T Lenfositlerin Oynadığı Efektör Rol	11
1.4. Otoimmün Hastalıkların Patogenezi	11
1.4.1. Otoimmün Hastalıklarda Genetik Yatkınlık	13
1.4.2. Otoimmün Hastalıklarda İnfeksiyonların Rolü ve Diğer Faktörler	15
1.5. İdiyopatik Trombositopenik Purpura	17
1.5.1. İTP Hastalığının Etiyolojisi ve Patogenezi	17
1.5.2. İTP Hastalığında Teşhis ve Tanı	20
1.5.3. İTP Hastalığında Tedavi	21
1.6. B Lenfosit Aktivasyon Faktör (BAFF)	23
1.6.1. BAFF Protein Yapısı	23
1.6.2. BAFF Proteininin Ekspresyonu	23
1.6.3. BAFF Proteininin Bağlandığı TNF Reseptörleri ve Yapıları	24
1.6.3.1. TACI Reseptörü	25

1.6.3.2. BCMA Reseptörü	26
1.6.3.3. BAFF-R Reseptörü	26
1.6.4. BAFF Proteinin B Lenfosit Hayat Döngüsü, Olgunlaşması ve Aktivasyonundaki Rolü	27
1.6.5. BAFF Proteinin Sinyal İleti Mekanizması	29
1.6.6. BAFF Proteinin Hastalıklardaki Rolü	30
1.6.6.1. Otoimmün Hastalıklarda BAFF Proteinin Önemi	30
1.6.6.2. Kanser Hastalıklarında BAFF'ın Rolü	32
1.6.6.3. Enfeksiyon Hastalıklarında BAFF Proteinin Rolü	33
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	34
3. ÇALIŞMANIN AMACI	38
4. MATERYAL VE YÖNTEM	39
4.1. Yöntem	39
4.1.1. Örnek Grubunun Oluşturulması ve Test Edilecek Materyal Toplanması	39
4.1.2. Kan Sayımı (Hemogram)	40
4.1.3. Serum İzolasyonu	40
4.1.4. DNA İzolasyonu	40
4.1.5. RNA İzolasyonu	40
4.1.6. cDNA Sentezi	43
4.1.7. Bioinformatik Yöntem ve PCR Primer Dizaynı	44
4.1.8. Gradient PCR	45
4.1.9. BAFF Promotor PCR	46
4.1.10. BAFF RT-PCR Reaksiyonu	47
4.1.11. PCR Ürünlerinden DNA Saflaştırılması	48
4.1.12. DNA Dizin Analizi	48
4.1.13. Serum BAFF Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Tespit Edilmesi	49
4.1.14. Klinik Değerlendirme ve Retrospektif Araştırma	51
4.1.15. İstatistiksel Analiz	51
4.2. Araçlar ve Materyal	52
4.2.1. Kullanılan Cihazlar	52
4.2.2. Materyal	52
5. BULGULAR	53

5.1. RNA İzolasyonu ile Elde Edilen Bulgular	53
5.2. DNA İzolasyonu ile Elde Edilen Bulgular	54
5.3. Gradient PCR Bulguları	54
5.4. BAFF Promotor ve cDNA PCR ile elde Edilen Bulgular	55
5.5. Biyoinformatik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular	56
5.6. ELISA Metodunda Elde Edilen Bulgular	57
5.7. Kontrol Grubuna Ait Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları	58
5.8. Aktif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları	59
5.8.1. Aktif İTP Hastalarının Sağlıklı Kontroller ile Serum BAFF Düzeyi Açısından Karşılaştırılması	59
5.9. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları	61
5.9.1. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF Seviyesinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması	62
5.10. Prednisolon ile İmmünespresif Tedavi Altında Bulunan İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları	62
5.10.1 Prednisolon ile İmmünespresif Tedavi Altında Bulunan İTP Hastalarının Serum BAFF Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması	63
5.11. Otoantikor Pozitif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları	64
5.11.1. Otoantikor Pozitif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesinin Sağlıklı Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması	64
5.12. BAFF cDNA ve Promotor DNA Dizinlerinin Analizi	66
5.12.1. BAFF Promotor DNA Dizin Analiz Bulguları	66
5.12.1.1. BAFF Promotor SNP'lerinin Biyoinformatik Karakteristikleri	68
5.12.2 BAFF cDNA Dizi Analizi Bulguları	69
6. TARTIŞMA	70
6.1. Serum BAFF Seviyesi Bulgularının Karşılaştırılması	70
6.2. İTP Hastalarının BAFF Promotor Dizileri İçerisinde Tespit Edilen SNP'lerin Değerlendirilmesi	71

7. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Vertebralılarda Antijen Reseptörlerinin Sentezinin Şeması	2
1.2. Antikor Aracılıklı Otoimmün Hastalıklarda Rol Oynayan Efektör Mekanizmaların Şeması	6
1.3 T Lenfosit Aracılıklı Efektör Mekanizmalar	10
1.4. Tip I Non Obez Diyabet (T1D) Hastalığı İçin Yatkınlık Sağlayan Fare Genomundaki Genlerin Kromozomal Lokasyonlarının Şeması	14
1.5. İnfeksiyon Ajanların Otoimmünitedeki Rolü ve Kendinden Olanı Tanıma Özelliğinin Şematik Gösterimi	16
1.6. BAFF ve APRIL Proteinleri ve Reseptörleri	25
1.7. BAFF ve APRIL Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları	28
1.8 BAFF ve APRIL Proteinlerinin Sinyal İleti Mekanizması	30
5.1 BAFF prmt for ve rev primerleri için yapılan Gradient PCR Sonuçlarının %0.8 Jel Elektroforez Profili	55
5.2 1072 bp Uzunluğundaki BAFF Promotor Dizisinin PCR Reaksiyon Sonucunun %0.8 Jel Elektroforez Profili	56
5.3 BAFF Geninin Organizasyonu	56
5.4 1072 bp Promotor Dizisi Üzerindeki Olası TF Bağlantı Dizileri	57
5.5 BAFF ELISA Standart Eğrisi	57
5.6. Kontrol Grubu ile Aktif İTP Hastalarının Serum BAFF Seviyesinin Karşılaştırılması	59
5.7. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF Düzeyinin Sağlıklı Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması	62
5.8 Prednisolon ile Tedavi Altında Bulunan İTP Hastaları ile Sağlıklı Kontrol Gurubunun Karşılaştırılması	64
5.9. Otoantikor Pozitif İTP Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Grubunun Karşılaştırılması	65
5.10 BAFF Promotor DNA Dizi Analizinde Gözlemlenen -871 SNP'si	67
5.11. -871 Pozisyonundaki C>T SNP'sinin Sonucu Oluşan MZF-1-CD34-Site (AGTGGGGA) TF Bağlanma Noktası	68
5.12 -771 Pozisyonundaki G>A SNP'sinin Sonucu Oluşan Est-vWF TF Bağlanma Noktası	69

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Hipersensivite Tiplerinin Sınıflandırılması	3
1.2. İmmün Kompleks Aracılıklı Otoimmün Hastalıklar	8
1.3. Çocuklarda ve Erişkinlerde Gözüken İTP Hastalığının Karşılaştırılması	18
1.4. İTP Hastalık Öyküsü ve Tercih Edilen Muayene Tipleri	20
1.5. Akut İTP'li Çocuklarda Kullanılan Tedavi Alternatifleri	21
1.6. Kronik İTP'li Hastalarda Tedavi Alternatifleri	22
4.1. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Listesi	45
4.2. BAFF Promotor Fragmenti Gradient PCR Reaksiyon Bileşenleri	46
4.3. BAFF Promotor Genomik PCR Reaksiyon Bileşenleri	47
4.4. BAFF RT-PCR protokolü	47
5.1. İzole Edilen Bazı RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü	53
5.2. Bazı Hastaların İzole Edilmiş DNA'larının Konsantrasyonları	54
5.3. Kontrol Grubunun Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları	58
5.4. Aktif İTP Hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları	60
5.5. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları	61
5.6. Prednisolon ile Tedavi Edilen Hastaların Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları	63
5.7. Otoantikor üretiminin tespit edildiği İTP hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları	65
5.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında BAFF Promotor SNP'leri	67

1. GİRİŞ

1.1. İmmün Cevap Kavramı

Dünya üzerindeki yaşam formlarının büyük kısmını mikroorganizmalar oluşturmaktadır ve bazı mikroorganizmalar, diğer yaşam formları üzerinde patojen etki gösterebilmektedir. Diğer yaşam formları da, bu patojenlere karşı savunma mekanizmalarına sahiptirler. Hedef organizmanın verdiği ilk immün yanıt doğal immün yanıt olarak adlandırılır. Bu yanıt, genomda germ-line kodlanmış reseptörler aracılığı ile oluşturulur ve bu reseptörler, evrimsel olarak yüksek korunmuş moleküler dizileri tanıyarak harekete geçer (Pancer and Cooper, 2006).

Yüksek omurgalı hayvanlarda doğal immün yanıtın yanısıra, lenfositler aracılığı ile oluşturulan ve adaptif immün cevap olarak adlandırılan patojenlere karşı ikinci bir savunma mekanizması bulunmaktadır. Tüm patojen ve toksinlerin olası antijenik yapılarını tanımak için, yüksek omurgalı organizmaların lenfosit membranlarının üzerinde bir reseptör havuzu bulunmaktadır. Bu havuz; lenfositlerin immünglobulin V (variable), D (diversity) ve J (joining) segmentlerinin farklı şekillerde yeniden yapılandırılması ile oluşturulur. Kıkırdak dokulu balıklardan başlamak üzere; tüm yüksek omurgalı hayvanlarda, Ig V(D)J bölgelerinin yeniden yapılandırılması ile oluşturulan antijen reseptör genleri T ve B lenfositlerin yüzeylerinde eksprese edilir (Cannon et al., 2002). Antijen uyarımı ile stimule edilen bu T ve B lenfositler hücre aracılıklı ve/veya humoral immün cevabı ortaya çıkarır.

İmmünglobulin (Ig) domainleri, evrimsel olarak korunmuş amino asit dizileri içeren bir protein süper ailesi olarak adlandırılır. Ig V (variable domainler) antijen reseptörlerinin ve dolayısı ile adaptif immün yanıtın temel elemanıdır. Omurgasız canlılarda; patojen tanıma ile kendinden olan olmayan ayrımını yapan immünglobülinlere benzer proteinler bulunmaktadır. Bunlar, Hemolin ve Fibrinojen ilişkili Hemolenf protein (FREPs) ailesine üye proteinlerdir ve alternatif kesme

olarak tanıyamaz. Organizmanın kendine ait antijenleri tanıyamaması ve onlara karşı bir immün yanıt oluşturmaması ile otoimmün hastalıklar ortaya çıkar.

Tablo 1.1’de hipersensivite tiplerinin sınıflandırılması şematize edilmiştir. Klinik özellikler bakımından immünolojik hastalıklar karmaşık ve birbiri ile kombine bir karakter gösterirler. Bir otoimmün hastalıkta; hem humoral, hem hücre aracılıklı, hem de birden fazla hipersensivite tipi ile kombine olmuş immün yanıt gözlemlenebilir.

Tablo 1.1. Hipersensivite Tiplerinin Sınıflandırılması (Abbas and Lichtman, 2005)

Hipersensivite tipi	Patolojik immün Mekanizma	Doku zedelenmesine neden olan mekanizma
Hızlı Hipersensivite Tip I	IgE	Mast hücreleri ve mediatörler (vazoaktif aminler, sitokinler ve mediatörler)
Antikor aracılıklı Hipersensivite Tip II	Hücre yüzeyi ya da ekstrasellüler matrikse karşı oluşturulan Ig M, Ig G antikorları	Hücrelerin opsonizasyonu ve fagositozu Nötrofil ve makrofajların komplement ve Fc reseptör aracılıklı aktivasyonu Hücre fonksiyonlardaki anormali (Hormon reseptör sinyal anormalisi)
İmmün kompleks aracılıklı Hipersensivite Tip III	Sirkülasyondaki antijen ve Ig G, Ig M aracılıklı immün kompleks oluşumu	Lökositlerin komplement ve Fc reseptör aracılıklı aktivasyonu
T Hücre aracılıklı Hipersensivite Tip IV	CD4+ T hücre (gecikmiş hipersensivite) CD8+ CTLs (T hücre aracılıklı hücre parçalanması)	Sitokin aracılıklı makrofaj aktivasyonu ve hücrenin hedeflenerek öldürülmesi

1.3. Doku Hasarını Oluşturan Efektör Mekanizmalar

İmmünolojik hastalıklarda görülen efektör mekanizmalar aslında, organizmanın patojenlere karşı savunma için oluşturduğu mekanizmalarla aynıdır. Bu hastalıklarda; benzer mekanizmalar kullanılmasına rağmen, söz konusu immünolojik savunmada, organizmanın kendi antijeni ya da yabancı antijenin tetiklediği; ancak kontrol edilemeyen bir immün yanıt nedeni ile organizmanın kendi yapısı hedef alınmaktadır. Otoimmün hastalıkları oluşturan efektör mekanizmalar antikor aracılıklı ve T hücre aracılıklı olmak üzere iki farklı mekanizma ile çalışırlar (Abbas and Lichtman, 2005).

1.3.1. Antikor Aracılıklı Efektör Mekanizmalar

Antikorların aracılık ettiği efektör mekanizmalar, sitotoksik hipersensivite ve immün kompleks aracılıklı hipersensivite olmak üzere iki farklı başlık altında sınıflandırılır. Antikor aracılıklı efektör mekanizmada ya üretilen otoantikorun direkt hücre ve/veya dokuya bağlanması ya da sirkülasyonda bulunan antijenlerle kompleks oluşturularak damar duvarlarına yapışması söz konusudur.

1.3.1.1 Sitotoksik Hipersensivite (Hipersensivite Tip II)

Hücre yüzey ve hücre matriks antijenlerine karşı oluşan antikorlar, antijenlerin bulunduğu hücre ve dokularda etkilerini gösterirler. Bir sistemik etkiden ancak antijenin hücresel ya da dokusal dağılımına bakılarak söz edilebilir. Otoantikorların oluşumunu; otolog antijenlerin indüklemesinin yanı sıra, bazı yabancı antijenler de indükleyebilmektedir. Bu antijenler alloantijen olarak adlandırılır ve organizmadaki antijenlerden biri ile antijenik determinantlarının bir kısmı benzer, ya da aynı yapıdadır. Bu benzer antijenik determinantlar sayesinde, üretilen antikor hem yabancı hem de otolog antijene karşı aktiftir.

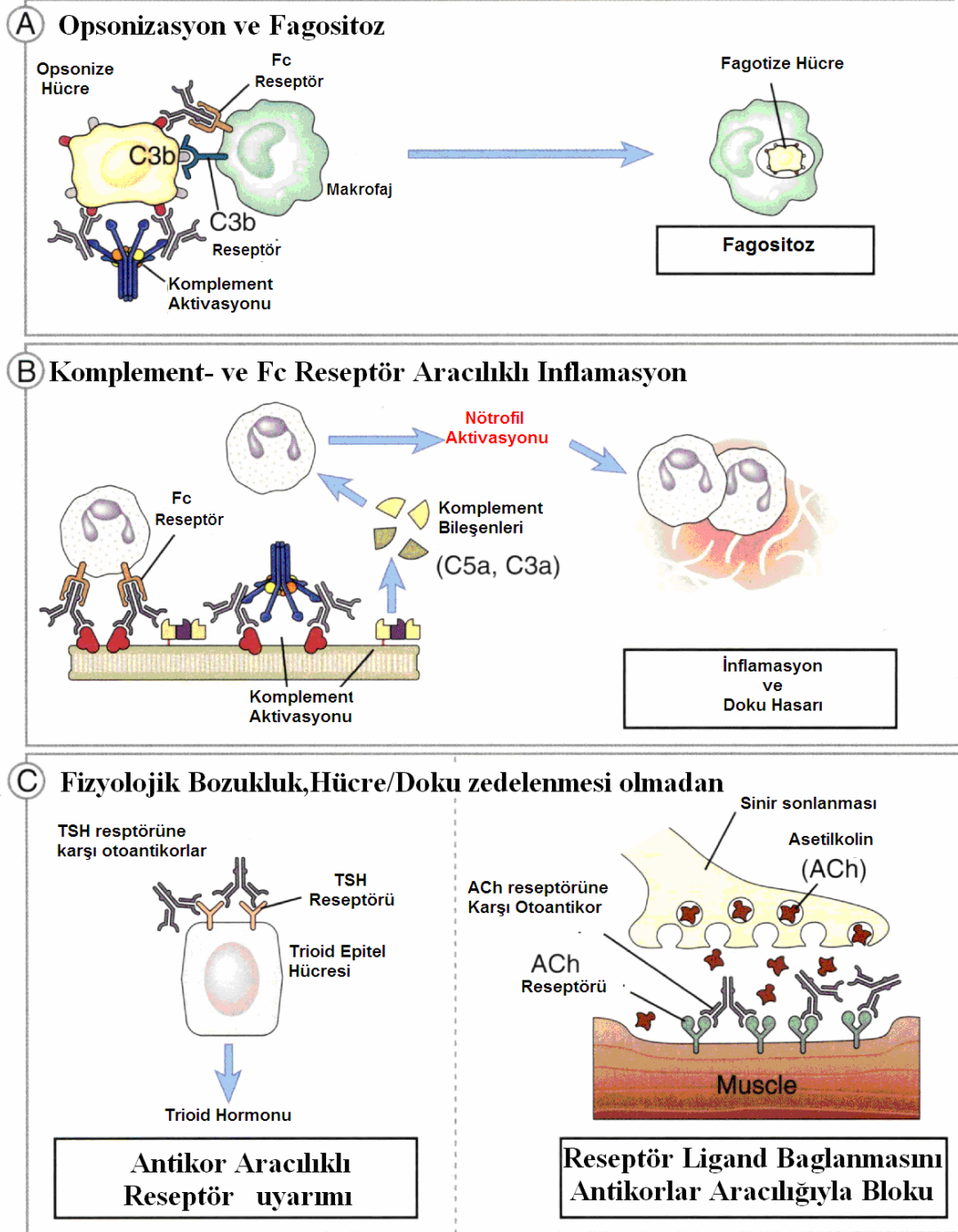
Otoantikörler, üç farklı mekanizma ile hastalığa neden olabilmektedirler. Bu mekanizmalardan ilki, otoantikörün hücre yüzeyini kaplaması ve komplement sistem proteinlerini aktive etmesidir. Bu hücreler, üzerlerinde komplement sistem ve antikörlerin Fc bölgelerine ait reseptörler taşıyan makrofajlar tarafından fagositoza uğrayarak elimine olurlar. Bu mekanizma, Otoimmün Hemolitik Anemi ve İdiyopatik Trombositopenik Purpura hastalıklarındaki hücre yıkımını sağlayan temel işlemdir (Şekil 1.2. A).

İkinci mekanizma; antikörlerin bir dokuda toplanarak, kendilerinin Fc reseptörleri ve komplement bağlayan reseptörleri olan nötrofil ve makrofaj hücrelerinin bu bölgeye göç etmesini sağlamalarıdır. Bu lökositler; aktive olmuş hücreler olup, salgıladıkları ürünlerle doku zedelenmesini ortaya çıkarırlar. Bu mekanizmayla oluşabilecek otoimmün hastalıklara Antikör Temelli Glomerulonefritis örnek verilebilir (Şekil 1.2. B).

Üçüncü mekanizma ise; oluşan antikörün hücre yüzeyinde bir reseptör ya da proteine bağlanarak ve o protein ya da reseptörün fonksiyonuna etki ederek, hücre üzerinde fonksiyonel bir bozukluğa neden olmasıdır. Myastina Gravis ve Hyperthyroidism bu mekanizmanın geçerli olduğu hastalıklara örnektir (Şekil 1.2.C).

1.3.1.2. İmmün Kompleks Aracılıklı Hipersensivite (Hipersensivite Tip III)

Bu tip hipersensivite; yabancı antijene ya da otoantijene antikörün bağlanıp, immün komplekslerin oluşması ile ortaya çıkar. İmmün kompleksler genellikle vücut sıvılarında oluşur. Buna rağmen, *in situ* oluşması da olasıdır. İmmün komplekslerin hastalık oluşturabilme yeteneği; onların büyüklüklerine, bağlanan antikora, elektriksel yüklerine ve diğer birçok faktöre bağlıdır.



Şekil 1.2. Antikor Aracılıklı Otoimmün Hastalıklarda Rol Oynayan Efektör Mekanizmaların Şeması (Abbas and Lichtman, 2005).

Büyük immün kompleksler, mononükleer fagosit sistem tarafından elimine edilir. Küçük immün kompleksler ise, suda çözülebilir olduğundan, mononükleer fagosit sistem tarafından elimine olmadan, küçük doku zedelenmelerine neden olabilmektedir. Zayıf antijen karakterde oluşan immün kompleksler, dokularda

çökelti oluşturma eğilimindedirler ve bundan dolayı doku zedelenmesine neden olurlar. İmmün komplekslerin hastalık oluşturma kapasiteleri, büyük oranda komplement sistemin aktivasyonuna bağlıdır (Susan and Chen, 2005).

İmmün kompleksin oluşturduğu semptomları incelemek için, deney hayvanlarına heterolog antiserum enjekte edilerek “serum hastalığı” oluşturulur. Enjeksiyonu takip eden 1–2 gün içerisinde, enjekte edilen proteini bağlayıp çökeltiye uğratan antikor üretimine başlanır. Bu immün kompleks çökeltileri arter duvarlarında, glomerus’da, eklemlerde ve serosal membranlar boyunca birikir. İmmün kompleks birikimi ile uyarılan komplement sistem; “Membran Attact Complex” (MAC) ya da Fc ve/veya C3b reseptör aracılıklı mekanizmalar ile söz konusu bölgelerde akut inflamasyon reaksiyonu oluşturur (Susan and Chen, 2005). Akut inflamasyon sonucu olarak da, doku hasarı olan Vaskulit, Glomerulonefrit, Artrit ve Seroitis gibi otoimmün hastalıklar ortaya çıkar. Bu şekilde ortaya çıkan hastalıkların bir listesi Tablo 1.2’de sunulmaktadır.

İmmün kompleks aracılıklı reaksiyonları incelemek için, Arthus Reaksiyonu kullanılır. Bu reaksiyonları oluşturabilmek için, bir dokuya direk antijen enjekte edilir. Sirkülasyonda bu antijene karşı bir antikor bulunması durumunda, lokal immün kompleks oluşur ve Akut Vasculitis’e neden olur. Eğer sirkülasyonda bulunan bir antijene karşı bir antikor lokal olarak bir dokuya enjekte edilirse, dokuda oluşan lezyon aynı karakterde olur. Arthus reaksiyonunda, 4 ile 10 saat arasında bir immün cevap oluşum süresi söz konusudur (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 2006).

Sistemik Lupus Eritromatozus, en iyi bilinen immün kompleks aracılıklı otoimmün hastalıklardan biridir. Bu hastalıkta, DNA ve/veya diğer antijenlere karşı oluşan antikorlar immün kompleks oluşturarak; kan damarları, böbrekler, eklemler gibi bazı dokularda birikirler. Bu durumda; aktive olan komplement sistemin tetiklediği akut inflamasyon ile hastalık kaynaklı semptomlar olan Vasculitis, glomerulonefritis ve polyserositis gözükür. Ayrıca, dermal-epiteryal bağlantı noktalarında oluşan immünglobulin birikimlerine SLE hastalarında deri lezyonlarına

neden olur. Bu tip hastalarda; sitotoksik antikorların varlığının gösterilmiş olması, bu hastalığın aynı zamanda, sınıflandırma açısından diğer efektör mekanizmalarında rol oynadığını göstermektedir (Feldmann et al., 1976; Bluestein, 1979).

Tablo 1.2. İmmün Kompleks Aracılıklı Otoimmün Hastalıklar (Abbas and Lichtman, 2005; Prud'homme, 2006)

<i>Hastalık</i>	<i>Hedef Antijen</i>	<i>Efektör mekanizma</i>	<i>Klinik özellik</i>
Otoimmün Hemolitik Anemi	Eritrosit membran protein (Rh faktör I antijeni)	Eritrositlerin opsonizasyon ve fagositozu	Hemoliz ve Anemi
Otoimmün trombositopenik Purpura	Trombosit membran proteini (gpII:IIIa integrin)	Trombosit opsonizasyon ve fagositozu	Kanama
Pemphigus Vulgaris	Epitelial Kadherin	Antikor Aracılıklı proteaz aktivasyonu ve hücreler arası kontakt inhibisyonu	Deride oluşan Vesiküller
Vasculitis (ANCA sorumlu)	Nötrofil granül proteini	Nötrofillerin degranülasyonu ve inflamasyonu	Vasculitis
Goodpasture's Sendromu	Glomerul ve alveol basal membranındaki non kollegen proteinler	Komplement ve Fc reseptör aracılıklı inflamasyon	Akciğerlerde kanama, Nefrit
Akut Romatoid Ateş	Streptokok Hücre Duvar Antijeni (myokardiyal antijenlerle Alloantijen)	İnflamasyon, Makrofaj aktivasyonu	Myokarditis, Arthritis
Myastina Gravis	Asetilkolin reseptörleri	Antikor aracılıklı reseptör inhibisyonu	Kas gerilemesi ve paralizi
Graves' Hastalığı	TSH reseptör	Antikor aracılıklı TSH reseptörünün stimülasyonu	Hyperthyroid ism
İnsülin dirençli Diyabet	İnsülin reseptörü	Antijen bağımlı insülin reseptör fonksiyon bozukluğu	Hiperglisemi, ketoasitoz
Pernisiöz Anemi	Gastrik parantial hücrelerdeki intristik faktör	İntristik Faktörün nötralizasyonu ve B ₁₂ vitamin absorpsiyonunun azalması	Anormal eritropoez, Anemi.

İmmün kompleks aracılıklı hastalıklardan bir diğeri de, diğeri hastalıklarda sekonder bir durum olarak da gözüken Glomerulonefrit'tir. Birçok hastada, Glomerulonefrit hiçbir başka primer hastalık olmadan ortaya çıkar. Primer olarak ortaya çıkan glomerulonefrit lezyonlarında, sirkülasyonda bulunan immün kompleksler genellikle gösterilememektedir. Fakat sifilis, tiroidi, hepatitis B de glomerulonefrit sirkülasyondaki immün kompleks ve antijenlerin glomerular basal membranda birikimi ile tanımlanmaktadır (Jennette et al.,1999).

Vasculitis, immün kompleks aracılıklı otoimmün hastalıklar ailesine ait hastalıklardan bir diğeridir. Glomerulonefrit hastalığında olduğu gibi, Vasculitis hastalığı da SLE gibi diğeri hastalıklarda sekonder bir fenomen olarak gözlemlenebilmektedir. İmmün kompleksin neden olduğu iki tip Vasculitis tanımlanmaktadır; bunlar hipersensivite kökenli Vasculitis ve polyarteritis nodosadır (Prud'homme, 2006). Lökostokastik Vasculitis olarak da adlandırılan hipersensivite kaynaklı Vasculitis, SLE gibi hastalıkların bir komponenti olarak gözlemlenebileceği gibi, spontane oluşumlu bir hastalık olarak da karşımıza çıkmaktadır. Arteriol, kapiller ve venüller gibi küçük kan damarlarının nekroze edici inflamasyonuyla zedelenmelerinden kaynaklanmaktadır. Polimorfonüklear lökositler damar duvarlarında gözlemlenir. Daha çok; deri, mukoz membranlar, böbrek, beyin de görülmesine rağmen, tüm dokularda oluşabilme ihtimali vardır. Vasculitis hastalıkları, çoğunlukla nötrofil sitoplazmik antijen (ANCA) otoantikoru ile beraber izlenmektedir (Jennette et al., 2006).

1.3.2. T-Lenfosit Aracılıklı Efektör Mekanizmalar

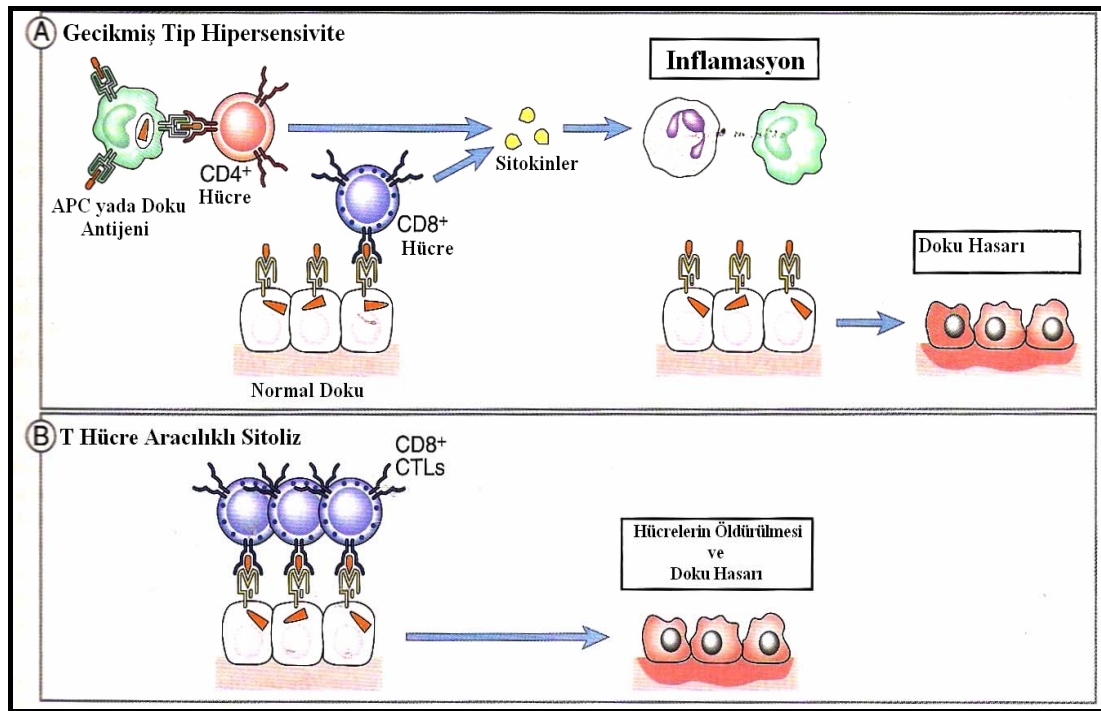
T lenfositler, ya direkt olarak hedef hücreyi öldürerek ya da gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonu (DTH) aracılığı ile otoimmün hastalıklara neden olur (Şekil 1.3).

Gecikmiş tip hipersensivite, CD4+ ve CD8+ T lenfositleri tarafından oluşturulan bir reaksiyondur. Bu iki hücre tipi tarafından salgılanan sitokinler ve özellikle interferon γ (IFN γ), makrofajları aktive ederek ile inflamasyon oluşturur

(Black,1997). Bazı T lenfosit aracılıklı hastalıklarda, sitotoksik T lenfositler “MHC Sınıf I” antijeni taşıyan hücreleri doğrudan öldürebilmektedirler. T lenfositler; otoreaktif olarak harekete geçebilmelerinin yanı sıra, hücre ya da dokulara bağlanabilen yabancı antijenler tarafından da harekete geçirilerek, otoimmün hastalıklara neden olabilirler.

1.3.2.1 Gecikmiş Tip Hipersensivite Reaksiyonu;

Bu mekanizma; hastalıklarda doku zedelenmesi ile aktive olan makrofajlar tarafından salgılanan hidrolitik enzimler, oksijen radikalleri, nitrik oksit ve proinflamasyon sitokinleri tarafından oluşturulur. Ayrıca, vasküler endotelial hücrelerden salgılanan sitokinler de bu reaksiyona katılırlar (Şekil 1.3. A).



Şekil 1.3. T Lenfosit Aracılıklı Eftör Mekanizmalar; **A-** Gecikmiş Tip Hipersensivite, **B-** T Lenfosit Aracılıklı Sitoliz (Abbas and Lichtman, 2005).

İnsan ve fare yardımcı T hücre klonları üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; klonal bazda üç temel sitokin üretim şekli söz konusudur (Mosmann, 1986). Bu bağlamda; T helper 1 klonal hücrelerinden IL-4, IFN-gamma, ve TNF-β, T helper 2 klonal hücrelerinden IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, ve T helper 0 klonal hücrelerinden hem Th1, hemde Th2 sitokinleri salgılanabilmektedir

(Romagnani,1994; Del Prete et al.,1994). Bu bağlamda; gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunda, diğer hipersensivite reaksiyonlarında olduğu gibi, özel sitokin salgılanma paterni gözlenir. Otoimmün hastalıklarda bu sitokin salgılanma paternleri ile hastalık arasında bir bağlantı mevcuttur (Mosmann, 1992). Bu nedenle, otoimmün hastalıklar düşünülürken, anormal sitokin salgılanmaları, özellikle T lenfositlerin efektör mekanizmaları önemli roller oynamaktadır.

1.3.2.2. Sitotoksik T Lenfositlerin Oynadığı Efektör Rol

Sitotoksik T lenfositlerin temel fizyolojik görevi, intrasellüler organizmaların eliminasyonu ve infekte hücrelerin öldürülmesidir. Bu noktada; Sitotoksik T lenfositler, virüs infeksiyonunun sitopatik olup olmadığını ayırmını yapmaz. Yani hücreye zararı olmayan bir virüs infeksiyonu da, sitotoksik T lenfositlerin infekte hücreyi yok etmesi için yeterlidir (Şekil 1.3. B) (Prud'homme, 2006).

Sadece sitotoksik T lenfositlerin sorumlu olduğu, birkaç otoimmün hastalık şimdiye kadar tanımlanmıştır. Bunlardan biri; CD8+ lenfositlerin kalp kasına infiltre olduğu, “Coxsackievirus B “ etkeni tarafından oluşturulan bir “Myokarditis” dir (Horwitz et al., 1998). Kalp kasında oluşan lezyonda; sınıf I MHC bağımlı sitotoksik T lenfositlerin yanında, infekte olmamış hücreleri öldüren sitotoksik T lenfositler de gözlemlenmiştir (Horwitz et al., 1998; Viviany, et al., 2005). Bu göstermektedir ki; virüs infeksiyonu ile primer lezyonun oluşmasının yanı sıra, otoantijenlerden kaynaklanan bir değişim, otoreaktif sitotoksik T lenfositlerin gelişimini sağlayarak otoimmün bir reaksiyonu ortaya çıkarmaktadır.

1.4. Otoimmün Hastalıkların Patogenezi

Otoantijenlerin otoreaktif lenfositler tarafından tanınması, devamında bu hücrelerin aktive olarak efektör hücrelere dönüşümü ve bu efektör hücreler ile bunların ürettikleri ürünlerin doku zedelenmesine neden olması, otoimmün hastalıkların en bilinen patogenezidir. Organizmanın kendinden olanı tanıma

özelliğinin ortadan kaybolması ve otoreaktif lenfositlerin aktivasyonunun nasıl geliştiği günümüzde otoimmün hastalıkların nedenlerini araştıran immünoloji bilim dalının ana temalarından birini oluşturmaktadır.

Otoimmün hastalıkların patogeneğinde aşağıdaki birkaç tema, patogeneğin temellerini oluşturur.

Otoimmünite; T ve/veya B lenfositlerdeki kendinden olanı tanıma özelliğinin tamamen ya da kısmi kaybının bir sonucudur. Lenfositler, vücuttaki tüm otoantijenlere karşı reseptör üretebilme potansiyeline sahiptirler. Lenfositlerin klonal seleksiyonu sırasında otoreaktif hücreler ortadan kaldırılır. Bu tolerans özelliğinin kaybı; seleksiyon mekanizmasında oluşan bir anormali nedeni ile oluşabileceği gibi otoantijenlerin antijen sunucu hücreler (APC) tarafından yanlış sunulması ya da otoreaktif lenfositlerin farklı regülasyonu nedeniyle de ortaya çıkabilir. T hücrelerine peptit antijenlerin sunumunda görev alan Büyük Doku Uyum Kompleksi (MHC) moleküllerinin bazı otoimmün hastalıklarda genetik ilişki göstermesi ve protein yapıdaki antijenlere karşı immün savunmayı gerçekleştiren T hücrelerinin immün sistemde geniş bir düzenleyici rol oynamaları, T hücrelerinin “kendinden olanı tanıma” özelliğinin kaybolması ve otoimmünite oluşumu arasında önemli bir ilişki bulunduğunu göstermektedir (Abbas and Lichtman, 2005).

Otoimmün hastalıkların sistemik ya da organ spesifik olması hastalığı oluşturan efektör mekanizmaların sorumluluğundadır. Örneğin SLE hastalığında gözlemlenen immün kompleks oluşumu, sistemik bir etki oluşmasını sağlarken, otoantijenlere karşı oluşan otoantikör ya da T hücre immün cevabı genellikle, organ spesifik doku zedelenmelerine neden olur (Craft and Fatenejad, 1995; Irie and Ridgway, 2005).

Otoimmün hastalıkların gelişiminden sorumlu olan majör faktörler, genetik yatkınlık ve virüs enfeksiyonu gibi çevresel faktörlerdir. Bu majör faktörlerin farklı şekillerde bir araya gelerek ortak çalışması sonucunda, kendinden olanı tanıma özelliğinde anormallikler ortaya çıkar.

1.4.1. Otoimmün Hastalıklarda Genetik Yatkınlık

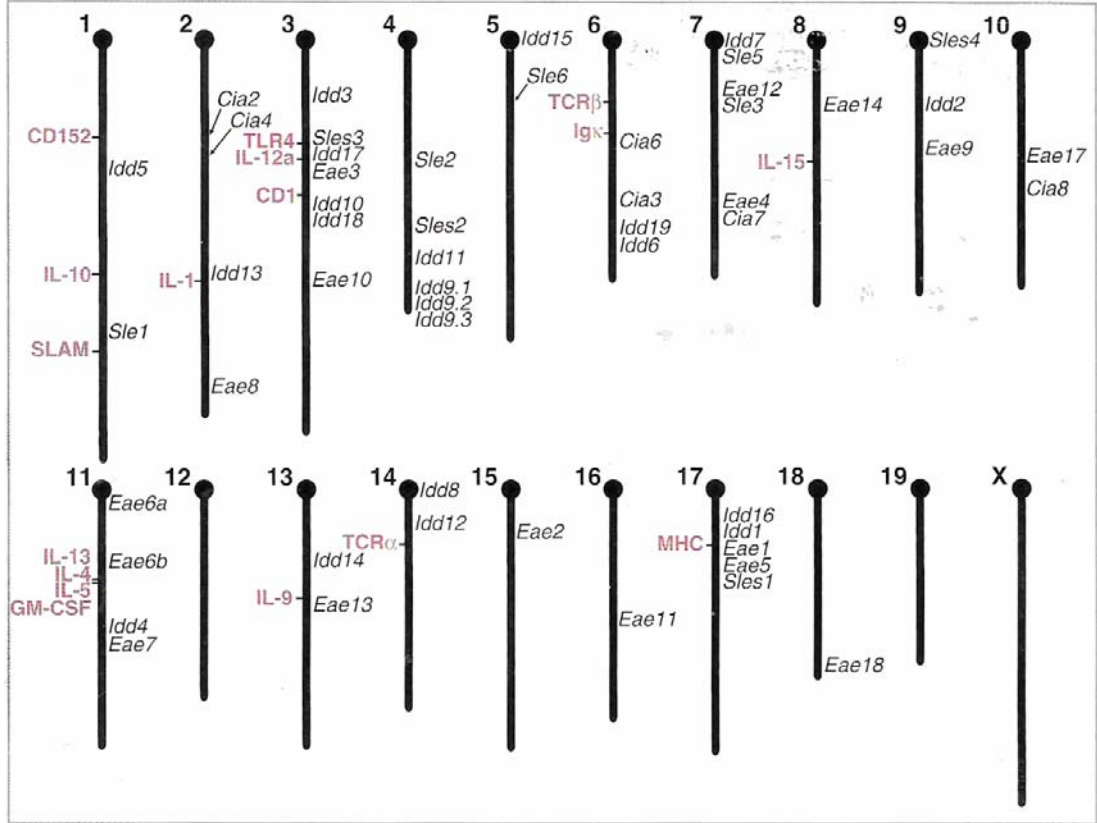
Otoimmün hastalıklar üzerinde yapılan ilk çalışmalardan bu yana, söz konusu hastalıkların genetik etmenlerinin de olduğu bilinmektedir. Monozigotik ikizler üzerinde yapılan incelemelerde; otoimmün tip I diyabet hastalığının ikizler arasında %35 ila 50 arasında bağlantı göstermesi, bunun en iyi kanıtlarından biridir (Redondo et al., 1999).

Otoimmün hastalıkların büyük bir kısmı çoğulcu genetik yapıda olup, çoklu polimorfizmlerin ortaya çıkardığı bir yatkınlık sonucu oluşmaktadırlar. Bu genetik özelliklerin büyük kısmı hastalıklara spesifik olmayıp, birbirinden farklı otoimmün hastalıklarda gözlemlenebilmektedir. Bu poligenetik yapı immün sistemin “kendinden olanı tanıma” özelliğinin parçalarıdır. Gen ve ürünlerinde kantitatif ve/veya yapısal değişimin immün sistemin bu özelliğinde aksamalara neden olarak, otoimmün hastalıkları oluşturmaktadırlar (Abbas and Lichtman, 2005).

Bu genlerin lokasyonları; aile ağacı ve kromozomal bağlantı analizleri sonucunda belirlenmiştir. Bu genler, geniş bir kromozomal dağılım göstermektedirler. Bağlantı analizleri yapılarak, lokalize edilen genlerin bir kısmının otoimmün hastalıklara yatkınlık oluşturmaktan sorumlu oldukları belirlenmiştir (Devendra et al., 2004). Bu bağlamda; Şekil 1.4’de gösterilen tip I Diyabet hastalığında, 20’nin üzerinde farklı genin kromozomal haritası çıkarılmıştır. Bağlantı analizleri ile oluşturulan bu gen haritasında bulunan genlerden bir kısmının, hastalığa yatkınlık sağladığı gösterilirken, bazılarının da sınıf II MHC geni gibi hastalık oluşumundaki efektör mekanizmalar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Devendra et al., 2004). Tip I Diyabet hastalığında; MHC Sınıf II bağımlı CD4+ lenfositlerin efektör mekanizmayı oluşturmaları ve insan ile fare genomunda ortak bulunmaları, bu genin önemini göstermektedir (Irie and Ridgway, 2005).

Tip I Diyabet hastalığında olduğu gibi, otoimmün hastalıklarla ilişkili birçok gen aynı zamanda “Major Histocompatibility Complex” (MHC) ile özellikle de

MHC Sınıf II genleri ile ilişkilidir. Otoimmün hastalık taşıyan hastalarda HLA (insan lökosit yüzey antijenleri) tiplene çalışmaları göstermiştir ki; bazı HLA allellere sahip gruplar otoimmün hastalıklara daha yüksek bir frekans ile yakalanmaktadır. HLA tiplmelerinden yola çıkarak, otoimmün hastalıklarda genetik yatkınlık oranları bir başka deyişle genetik risk oranları günümüzde hesaplanmaktadır (Devendra et al., 2004).



Şekil 1.4. Tip I Non Obez Diyabet (T1D) Hastalığı İçin Yatkınlık Sağlayan Fare Genomundaki Genlerin Kromozomal Lokasyonlarının Şeması (Abbas and Lichtman, 2005).

Ankylosing Spondilitis olarak adlandırılan, omurgaların eklemlerinde oluşan otoimmün hastalık ile MHC sınıf I HLA-B27 alleli arasında bulunan güçlü ilişki buna en iyi örnektir. Yapılan çalışmalar; HLA-B27 pozitif genotipe sahip bireylerin negatif genotipe sahip bireylere oranla, 80 ila 100 kat daha fazla hastalığa yakalandığını göstermekte olmasına rağmen, bu ilişkinin moleküler temelleri henüz tam olarak bilinmemektedir (Singleton et al., 2006).

MHC sınıf HLA-DR ve HLA-DQ genotipler ile otoimmün hastalıklar arasında güçlü bir ilişkinin olduğu, son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bunun moleküler temellerinin, MHC sınıf II moleküllerinin hem hormonsal hem de hücrel immün cevabın düzenleyicisi konumunda olan, CD4+ T lenfositlerin negatif seleksiyonunda ve aktivasyonunda görev alması olduğu düşünülmektedir (Abbas and Lichtman, 2005).

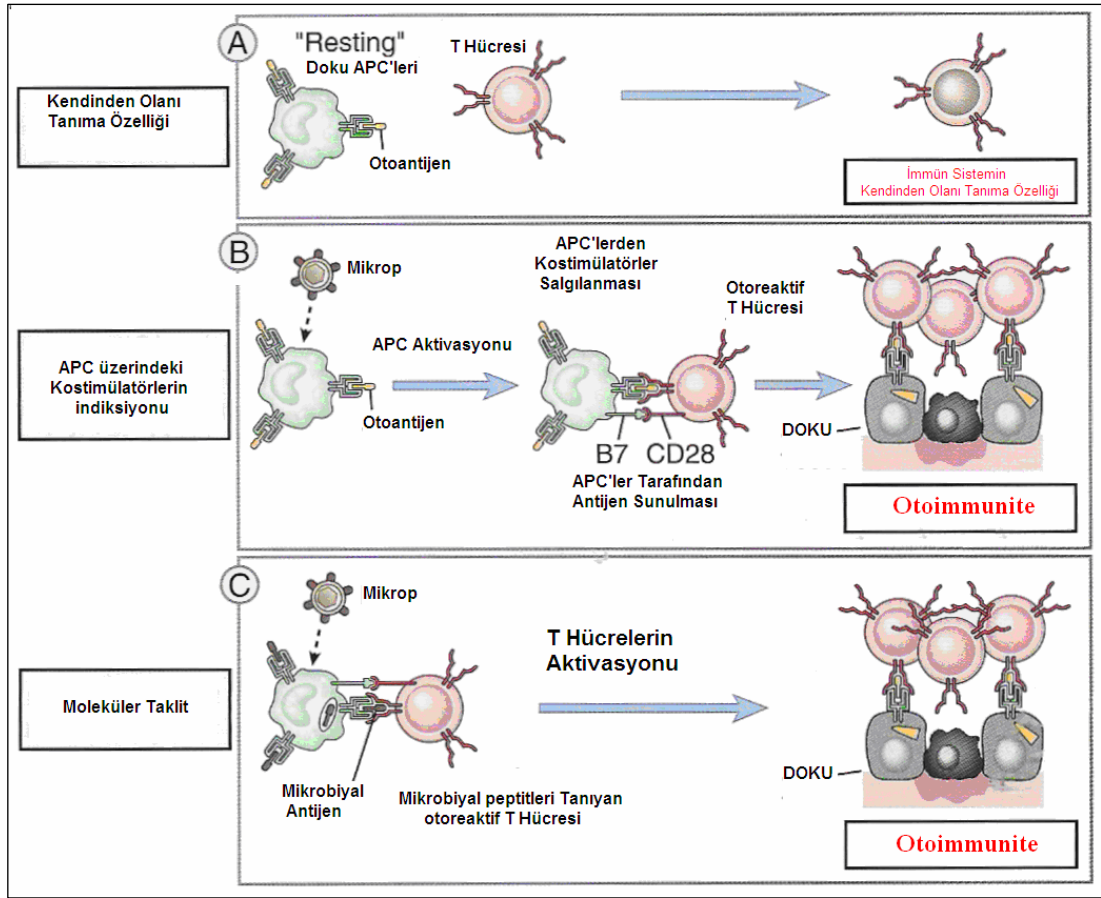
1.4.2. Otoimmün Hastalıklarda Enfeksiyonların Rolü ve Diğer Faktörler

Bir dizi otoimmün hastalık taşıyan bazı hastalarda daha önceden geçirilmiş, ya da aynı anda geçirilmekte olan bir enfeksiyonun var olduğu gözlemlenmiştir (Lampert et al.,1973; Powell et al.,1975). Bu gözlemler, viral ya da bakteriyel enfeksiyonlar ile otoimmün hastalıklar arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Miller et al.,1997). Birçok durumda; enfeksiyon etkeni olan virüs ya da bakterinin, otoimmün doku zedelenmesinin olduğu lezyondaki varlığı gösterilememiştir (Lampert et al.,1973). Enfeksiyonun lezyonun oluşmasında direkt bir etkisi olmasa da, mikrop tarafından yanlış regüle edilen immün cevabın otoimmün reaksiyonu tetiklediği düşünülmektedir (Abbas and Lichtman, 2005).

Enfeksiyon ajanları iki farklı mekanizmayla otoimmüniteye neden olurlar. Birinci mekanizmada; bir bölgede oluşan inflamasyonda, bölgeye yerleşen lökositlerin doku kaynaklı APC'lerden (Antijen Sunucu Hücreler) kostimulatörlerin hatalı eksprese edilmesini sağlaması ve T lenfositlerin kendinden olanı tanıma mekanizmasında bir aksama gerçekleştirmesi durumu görülür. Bu şekilde enfeksiyon ajanına özgü olmayan otoreaktif T hücreleri aktive edilir. Bu aktivasyon, “yedek aktivasyon” olarak adlandırılır ve inflamasyonun olduğu dokudan göç eden APC'lerin otoreaktif T hücrelerini aktive etmesi ile oluşur (Horwitz et al., 1998; Horwitz et al., 1999).

İkinci bir mekanizma ise; enfeksiyon ajanının otoantijenlerle çapraz reaksiyona girebilecek bir antijeni (alloantijen) barındırmasıdır. Bu durumda; yabancı kaynaklı

antijene karşı gelişen immün cevap, aynı zamanda otoantijene karşı da gelişmiş olur (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. İnfeksiyon Ajanlarının Otoimmünitedeki Rolü ve Kendinden Olanı Tanıma Özelliğinin Şematik Gösterimi (Abbas and Lichtman, 2005).

Genetik yatkınlık ve infeksiyonların yanı sıra, otoimmün hastalıkların gelişiminde birkaç önemli faktör de otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynar. Bunlardan biri; sekonder bir inflamasyon, iskemi, travma gibi anatomik değişiklikler sonucu otoantijenlerin miktar olarak artmasıdır. Dokuda artan serbest antijenler değişik immün komponentlerle birleşerek, yeni antijenik determinantlar kazanırlar ve immün sistemin otoantijenlere karşı aktivasyonunda görev alabilirler. Otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynayan ikinci bir faktör de, hormonların etkisidir. Birçok otoimmün hastalığın kadınlarda görülme oranı, erkeklerden daha yüksektir (Abbas and Lichtman, 2005).

1.5. İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP- Nedeni Açıklanamayan Trombosit Bağımlı Kanama Hastalığı)

İdiyopatik trombositopenik purpura veya diğer adıyla primer immün trombositopenik purpura, nedeni bilinmeyen ve derialtı kanamalar (mukokutanöz) ile seyreden otoimmün bir hastalıktır (Lilleyman et al., 1999).

Erişkin ve çocuklarda, klinik özellikleri birbiriyle tam olarak uyuşmayan iki farklı tipi gözlemlenebilmektedir. Çocuklarda akut olarak ortaya çıkan bu hastalık genellikle 6 ay içinde spontane bir iyileşme göstermektedir. Buna karşılık, yetişkin tip İTP (AİTP) olarak adlandırılan ve erişkinlerde gözlemlenen hastalık çok nadir olarak kendiliğinden düzelme eğilimi göstermektedir. Tablo 1.3’de İTP hastalığının çocuk ve erişkinlerde gözlemlenen özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Beutler et al., 2001).

İTP hastalığının çocuklardaki görülme sıklığı; her 100.000 kişide 3–8 iken, erişkinlerde 5’dir (Sutor et al.,1996). AİTP, kadınlar ve diğer otoimmün hastalıkları taşıyanlar ile yaşlılarda daha sık olarak gözlenmektedir. Yaşlı İTP hastalarında artmış kanama riski nedeniyle, özel koruyucu tedaviler uygulanır (George et al.,1998).

1.5.1. İTP Hastalığının Etiyolojisi ve Patogenezi

İTP hastalığındaki klinik belirtilerin sorumlusu, başta dalak olmak üzere; karaciğer, kemik iliği ve akciğerlerde trombosit yıkım hızının artmasıdır. Normal vücutta bulunan trombositlerin üçte birini bulunduran dalak, bu noktada önem kazanmaktadır. Özellikle dalakta gözlemlenen trombositlerin yıkımı, toplam yıkımın büyük bir kısmını teşkil etmektedir. Bu yıkımda, dalakta gözlemlenen lenfoid hiperplazinin önemli olduğu düşünülmektedir. Trombosit yıkımının neden olduğu trombositopeninin şiddeti, megakaryositler tarafından trombosit üretiminin hızlandırılması ile dengelenir ve trombosit yıkımı ve üretimi arasındaki denge de hastalığın şiddetini belirler (Ören, 2002; Beutler et al., 2001).

Tablo 1.3. Çocuklarda ve Erişkinlerde Gözüken İTP Hastalığının Karşılaştırılması (Beutler et al., 2001)

Klinik Özellik	Çocuk tipi	Erişkin Tipi
Yaş	2–4	15–40
Cinsiyet (K:E)	1:1	4:1
Hastalık oluşumu	Akut	Semptomlar şeklinde
Semptomlar	Purpura	Purpura
Trombosit sayısı	< 20.000	< 20.000
Spontan Remisyon	%83	%2
Kronikleşme	%24	%46
Splenektomiye Cevap	%71	%66
Tam iyileşme	%89	%64
Beyin Kanaması	%1	%3
Kanama nedenli ölüm	%1	%4
Kronik hastalarda ölüm oranı	%2	%5

İTP hastalarının serumu normal insanlara enjekte edilerek, bu insanlarda trombositopeni oluşturulabilmesi nedeniyle, İTP hastalığının etken faktörünün gamma globülinler olduğu kanaatine varılmıştır (Harrington et al.,1951). Daha sonraları faktörün IgG olduğu gösterilmiştir (Shulman et al., 1965). Leeuwen et al. (1982), bulunan bu Ig'nin trombosit membranındaki glikoproteini (Gp IIb/IIIa) hedef aldığını göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda; İTP hastalığının, plazmada bulunan trombositlerin membranlarındaki GpIIb/IIIa, GpIb/IX, GpV, GpIV ve diğer spesifik membran proteinlerine karşı oluşmuş, IgG ve/veya IgM tipi otoantikorlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (George, 1989).

Trombosit yüzeyinde bulunan ve anti-trombosit otoantikorlarına antijenik determinant oluşturan glikoproteinler ayrıca, megakaryositlerin hücre membranlarında da sentez edilebilmektedirler. Megakaryositlerin bu otoantikorların hedefi olması nedeniyle, trombosit üretim hızı da bu antikorlar tarafından bloke edilebilmektedir. Bu da, hastalığın oluşumunda ve gelişiminde etkili olabilen, ikinci bir yan mekanizma olarak tanımlanmaktadır (Chang et al., 1999).

Trombositlerin yıkımı; üzerlerine bağı olan otoantikorların Fc uçlarının, Makrofaj ve Monositlerin Fc reseptörleri tarafından tanınarak, fagositoz edilmesi ile gerçekleşmektedir. Trombositlerin yıkımında, komplement sistem ve T hücre aracılı immün sistemin de rol aldığı düşünölmekle birlikte, bu sistemlerin hastalığın patofizyolojisinde nasıl yer aldığı, moleküler düzeyde hala araştırılmaktadır (Beutler et al., 2001).

Hastalığın prognozunda; trombosit yıkımı ile ortaya çıkan hücre membran glikoproteinleri, APC'ler tarafından gerek T, gerekse B hücrelerine sunulurlar. Bu sayede, CD4+ T hücreleri ve salgılanan sitokinler tarafından B lenfositlerin otoantikor salgılayan klonlarının proliferasyonu artırılır. Kronik İTP hastalarında yapılan çalışmalarda; T supressör hücrelerin etkinliğinin azaldığının gösterilmesi, ayrıca T hücre aktivasyonunda görevli interferon γ (IFN γ), IL-10 ve IL-2 seviyesindeki yükselme T hücre aracılıklı immün reaksiyonların trombosit yıkımında daha önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Semple and Freedman,1991; Beutler et al., 2001). Buna karşın; akut İTP hastalığında, bir infeksiyon nedeniyle yabancı ve otoantijenlerin benzerliğinden kaynaklanan bir çapraz reaksiyonun etkin olduğu düşünölmektedir. Kronik İTP'de otoantikor oluşumunun; HLA-DR doku uyum kompleksi, T hücre aktivasyonu ve artmış sitokin salınımına bağı olarak geliştiğı düşünölmektedir. Her ne kadar, akut ya da kronik hastalığın başlangıcında ve/veya prognozunda çeşitli farklılıklar gösterilse de, oluşmuş bulunan immün yanıtın sonlandırılması noktasında her iki tipte de bir bozukluk söz konusudur (Beutler et al., 2001).

Yapılan genetik analizlerde, HLA-Drw2 ve DRB1*0410 genotipli popölasyonda kronik İTP hastalığının insidansının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Nomura et al.,1998). Özellikle steroid tedaviye cevap verme ile bu genotipler arasında ters bir korelasyon bulunmaktadır. Makrofajlardaki Fc γ reseptörleri, TNF ve LTA (Lenfotoksin alfa) genlerinde görölen polimorfizmlerin, gerek hastalık oluşumunda gerekse tedaviye verilen cevap açısından, bir bağılantı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Foster et al., 2001; Douglas et al., 2002). Aynı zamanda, HPA-5b ve HPA-2 genotipinin de İTP açısından bir risk grubu oluşturduğu gözlemlenmiştir (McMillan, 2000).

1.5.2. İTP Hastalığında Teşhis ve Tanı

Erişkin İTP hastalarının çoğunluğu; uzun süreli purpura şikayetleri ile hastaneye başvururken, çocuk tipi İTP hastaları genellikle, akut klinik bir tablo ile hastaneye başvururlar. Çocuk tipi İTP hastaları genellikle, bu akut klinik tablodan 1–2 hafta öncesinde bakteriyel ya da viral bir enfeksiyon geçirmiş olurlar. Bunun yanı sıra, immün tipteki bir trombositopeni, virüs aşları sonrasında da çocuklarda gelişebilmektedir. Tablo 1.4., İTP de hastalık öyküsü ve tercih edilen muayene tiplerini göstermektedir (Beutler et al., 2001; Ören, 2002).

Özellikle kronik İTP hastalığının ayırıcı tanısında; kemik iliği aspirasyonu, trioid fonksiyon testleri, batin ultrasonografisi, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), ANA (antinükleer antikoru), anti-dsDNA otoantikörleri, direkt Coomb's testi, MAIPA ile anti-trombosit otoantikörleri, serum immünglobulin elektroforezi, koagülasyon testleri, CMV, HIV, EBV, VZV, Rubella, Parvovirus B19 gibi virüs seroloji test çalışmalarının yapılması, hastalığın gerek etiyolojisine gerekse terapisine uygun yaklaşım sağlar. Çocuklarda özellikle konjenital trombositopeninin ayırımı, tanı açısından önem arz eder (Beutler et al., 2001; Ören, 2002).

Tablo 1.4. İTP Hastalık Öyküsü ve Tercih Edilen Muayene Tipleri (Ören, 2002)

Hikaye	Fizik Muayene
● Kanama semptomları - Kanamamanın tipi - Kanamamanın şiddeti - Kanamamanın süresi - Daha önceki kanamaların hikayesi ● Sistemik semptomlar - Son altı hafta içinde geçirilmiş enfeksiyon veya aşılanma hikayesi - İmmün yetmezliği düşündürecek tekrarlayan enfeksiyon hikayesi - Otoimmün hastalık semptomları ● İlaçlar - Heparin, sulfanamidler, karbamazepin, sodyum valproat, digoxin, kinidin/kinin trombositopeniye sebep olabilir - Aspirin kanamayı artırabilir ● Maternal HIV dahil HIV enfeksiyonu riski ● Trombositopeni veya kanama hastalıklarına yönelik aile hikayesi ● Altı aydan küçük infantlarda perinatal ve maternal öykü ● Kanama riskini arttıracak diğer durumlar ● Yaşam şekli (travmatik aktiviteler vs.)	● Kanama bulguları - Kanamamanın tipi (retinal kanama dahil) - Kanamamanın şiddeti ● Karaciğer, dalak ve lenf nodu palpasyonu ● Enfeksiyon bulguları ● Konjenital hastalığı destekleyen dismorfik bulguların bulunması ve spesifik konjenital sendromların ekarte edilmesi

MAIPA (Trombosit Antijenlerine Özgül Monoklonal Antikorların İmmobilizasyon Testi) yönteminin geliştirilmesi ile hem plazmadaki serbest anti-trombosit otoantikorları, hem de Trombosit yüzeyine bağlanmış bulunan otoantikorlar gösterilebilmektedir (Kiefel et al.,1987). Bu yöntemde hastaların % 20'sinden fazlasında otoantikorların varlığı gösterilememektedir. Bu noktada, geniş klinik tanı yöntemi olarak kullanılan MAIPA yönteminin hassasiyet ve özgüllüğünün haricinde, hastalığa neden olan başka fizyopatolojik mekanizmaların da var olduğu düşünülerek, negatif sonuçlanan MAIPA testlerinden sonra dahi, İTP tanısından uzaklaşmamak gereklidir (Beutler et al., 2001; Ören, 2002).

1.5.3. İTP Hastalığında Tedavi

Çocuklarda gözüken İTP hastalığının tedavisinde, hastalığın akut karakteri ve genellikle kendiliğinden remisyonu nedeniyle, gelişimin izlenmesi dışında tedaviye yönelik bir ilaç tedavisi uygulanmaz. Bu durum, genellikle trombosit sayısı 50–100 bin arasında olan çocuk ve erişkin hastalar için geçerlidir. Trombosit sayısının 20.000'in altına düştüğü çocuk hastalarda; intrakranial kanama riskinin artması nedeniyle, Tablo 1.5'de verilen tedavi protokollerinden biri ya da birbiri ile kombine şekilde bir kaç, hastanın klinik durumuna göre uygulanır. Bu tedavi protokolü; erişkin hastalar için de geçerli olup, akut İTP'li hastalarda da uygulanan protokoldür.

Tablo 1.5. Akut İTP'li Çocuklarda Tedavi Alternatifleri (Ören, 2002)

İlaç	Doz
Oral prednizolon	● 2 mg/kg/gün 14-21 gün (son 7 gün azaltarak) ● 60 mg/m² maksimum doz 80 mg/gün 21 gün (son 7 gün azaltarak) ● 4 mg/kg/gün 7 gün, 2 mg/kg/gün 7 gün, 7 gün daha azaltarak, 1.hafta maksimum doz 180 mg/gün.
İntravenöz metilprednizolon	● 10-30 mg/kg/gün 3-7 gün, >15 dk'lık İV infüzyon, maksimum doz 1g/gün
İViG	● 0.8 g/kg/gün 1 doz ● 1g/kg/gün 2 gün ● 250 mg/kg/gün 2 gün ● 400 mg/kg/gün 5 gün ● 400 mg/kg/gün 2 gün ● 500 mg/kg/gün 2 gün
Anti-Rh (D)	● 25 mcg/kg/gün 2 gün ● 45-75 mcg/kg/gün 2 gün

Yetişkinlerde ise; uygulan tedavilere cevap verilmediği durumlarda, hastalığın kronik karakterde olduğu düşünülerek, Tablo 1.6’da verilen protokoller, hastalığın klinik karakterine göre kombine edilir. Uygulanan tüm tedavilere cevap vermeyen hastalarda, splenektomi radikal bir tedavi metodu olarak uygulanabilmektedir. Splenektominin uygulanmasına hastalığın gelişimine göre karar verilmekle birlikte, bunun uygulandığı bazı hastaların bu tedaviye de cevap vermediği gözlemlenmiştir. Bu hastalarda immün supresif tedaviye splenektomi sonrası da devam edilir (Beutler et al., 2001; Ören, 2002).

Tablo 1.6. Kronik İTP’li Hastalarda Tedavi Alternatifleri (Ören, 2002)

<i>Tedavi</i>	<i>Doz</i>	<i>Yanıt Süresi</i>	<i>Yan Etki</i>
<i>1.Düzye Tedaviler</i> Prednisone	1 mg/kg/gün PO	1-4 hafta	Hipokalemi, gastrik hassasiyet, hiperglisemi, su ve tuz tutulması, myopati, osteoporoz, immün-supresyon, psikoz
Dexametazon	40 mg/gün PO ayda 1 kez 4 gün (6 siklus)	1-4 hafta	Prednizonla aynı.
İViG	0.5-1 g/kg İV 1-3 gün	1-4 hafta	Hemolitik anemi, baş ağrısı, kusma, aseptik menenjit
Vincristine	1-2 mg/hafta İV	7-10 gün	Periferik nöropati, alopezi, konstipasyon, lokal nekroz
Danazol	10-15 mg/kg/gün PO 3-6 ay	3-6 ay	Kilo alımı, hirsutizm, amenore, hepatotoksisite, döküntü, trombositopeni
Colchicine	0.6 mg x3 PO	4-8 hafta	Diare, kusma, bulantı
Dapsone	75-100 mg/gün PO	4-8 hafta	Hemoliz, agranülasitoz, aplastik anemi, dermatit, hepatit, sarılık, periferik nöropati
Cyclosporine	2.5 mg/kg x2 PO	Değişken	Renal ve hepatik toksisite, hipertansiyon, tremor, hirsutizm, sekonder malignensi
<i>2.Düzye Tedaviler</i> Staphylococcal-A immünoadsorpsiyon	3 kez/ hafta 6 kez	1-2 hafta	Ateş, ağrı, kusma, distres, vaskülit, dispne
Cyclophosphamide	150 mg/gün PO	6-8 hafta	Sitopeni, hemorajik sistit, kusma, sterilite
Azathioprine	150 mg/gün PO	2-10 ay	Sitopeni, kusma, sekonder malignensi
<i>3.Düzye Tedaviler</i> Yüksek doz cyclophosphamide	1-1.5 g/m ² IV 4 haftada 1 (yanıt yoksa 2, varsa en az 3 kez)	1-4 hafta	Aynı
Kombine kemoterapi	CYC+VCR+Pred+ procarbazine veya CYC+Pred+VP16 ayda 1 (yanıt yoksa 2, varsa 6 kez)	1-6 hafta	Aynı
<i>4.Düzye Tedaviler</i> Alfa-interferon	3 milyon Ü SC haftada 3 kez 12 doz	Değişken	Kırgınlık, baş ağrısı, ateş, sitopeni, kardiomyopati, taşikardi, hepatotoksisite, depresyon, tiroid fonksiyon bozukluğu
Vinblastine	5-10 mg/hafta İV	7-10 gün	Lökopeni, alopezi, konstipasyon, lokal nekroz.

1.6. B Lenfosit Aktivasyon Faktör (BAFF)

1.6.1 BAFF Protein Yapısı

B hücre aktivasyon faktör olarak adlandırılan, 285 amino asit uzunluğundaki bu protein, tümör nekrozan faktör ailesinin bir üyesidir. BAFF sinonimi olarak, BLyS, zTNF-4, TALL-1, THANK, TNFSF13b isimleri de kullanılmaktadır (Schneider et al., 1999). BAFF, kendinden sonra tanımlanan, % 27 oranında yapısal identik olduğu apoptoz indükleyici ligand (APRIL) gibi tip II membran proteinleri sınıfına girmektedir (Moore et al., 1999). Bu ligandların birçoğu gibi BAFF'da, aynı zamanda hücre dışı ortama soluble (sBAFF) şekilde sentezlenebilmektedir. Membran formundaki BAFF'ın translasyon sonrası modifikasyonu ile oluşan SBAFF, daha küçük bir amino asit dizisine sahiptir.

BAFF 124. amino asit pozisyonunda bir glikozitasyon noktası ile, 133 amino asit pozisyonunda proteolitik cleavage noktası bulundurmaktadır. BAFF ve APRIL ligandları birbirinden farklı içerik ve uzunluktaki bir sap domaini ve bir tümör nekrozan faktör homoloji (THD) domaininden oluşmaktadır (Bodmer et al., 2002). BAFF proteininin 145–284 a.a.'leri arasındaki bölge THD domaininin bulunduğu pozisyonudur (Schneider et al., 1999; GeneCard, 2006).

BAFF; hem hücre yüzeyinde, hem de ekstrasellüler formda serumda bulunabilmektedir. BAFF yapısının *in vivo* incelenmelerinde, furin kesim bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir (Bodmer et al., 2002).

1.6.2 BAFF Proteininin Ekspresyonu

Temel olarak BAFF; dolaşımdaki mononükleer hücreler, dalak, lenf nodları ve eser miktarlarda diğer dokular tarafından sentezlenmektedir. BAFF sentezleyen hücre tipleri ise; Monosit, Makrofaj, Dendritik hücreler ve T hücreleri şeklinde sıralanır (Schneider et al., 1999). Normal B lenfositler tarafından ise, sentezlenmez. Fakat, B hücre kökenli Kronik Lenfositik Lösemi (B-CLL) hastalarında ve diğer bazı

lenfomalarda B hücrelerin BAFF sentezlediği gözlemlenmiştir (Novak et al., 2002). BAFF knockout ve BAFF antagonistleri uygulanmış fareler üzerinde yapılan çalışmalar, B lenfositlerin hayatta kalması ve maturasyonu için temel bir BAFF ekspresyonunun zorunlu olduğunu ortaya koymuştur (Schiemann et al., 2001).

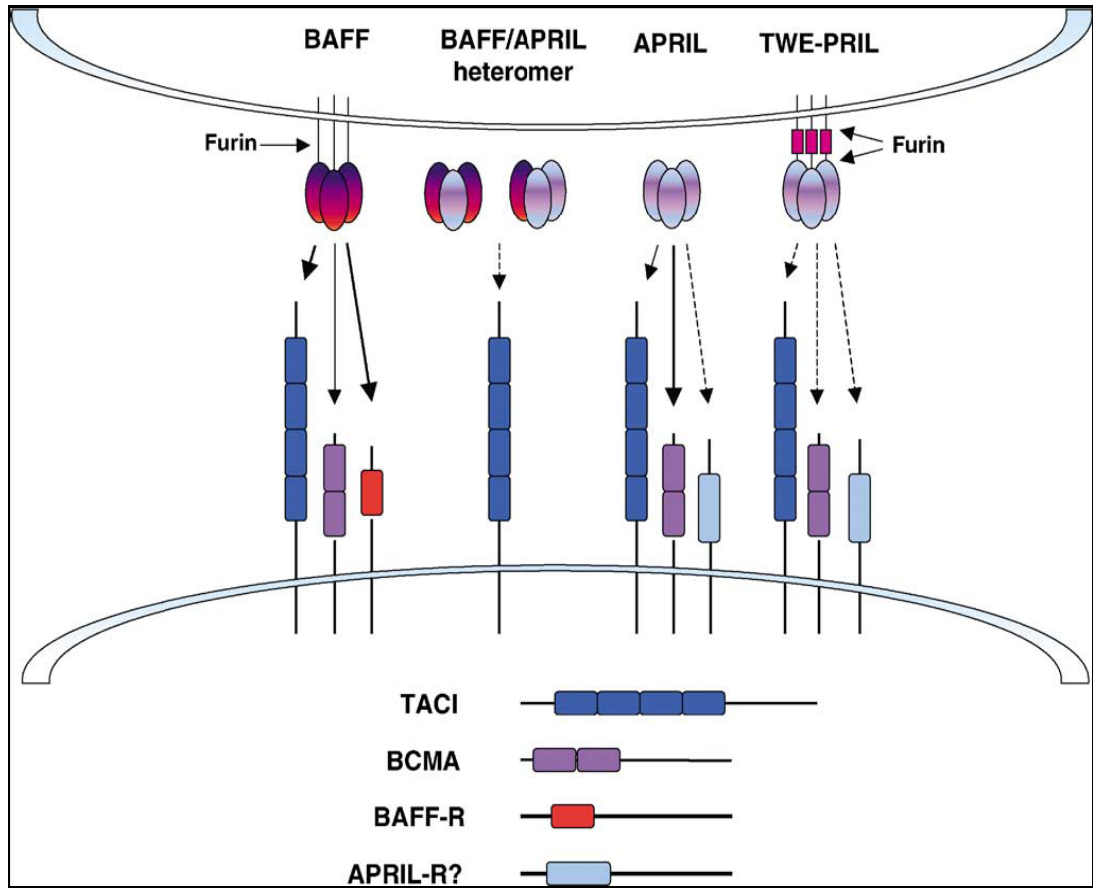
Aktive olmamış monositler de membran formundaki BAFF protein seviyesi düşük iken; IFN α , IFN β LPS, IL-10, gibi monosit aktivasyon inhibitörleriyle muamele edilmeleri durumunda membran bağlı BAFF ekspresyonu pozitif regüle edilir. Makrofaj ve dendritik hücre yüzeyindeki BAFF seviyesi de IFN γ ve IFN α uyarımı ile yükselir. Membran bağımlı BAFF ekspresyonu monositlerde IFN γ ve IL-10 tarafından etkilenmezler (Shu et al., 1999). LT β reseptör ligasyonu ya da CD40 gibi diğer TNF elemanlarının da BAFF ekspresyonu üzerinde pozitif regülasyonunun olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer taraftan negatif regülatör olarak, IL-4 ve PMA/ionomycinnin rol aldığı gösterilmiştir (Litinskiy et al., 2002). Membran bağlı, ya da sBAFF ekspresyonunun kontrol mekanizması büyük bir kompleksite göstermekle birlikte, henüz tüm yönleri ile bilinmemektedir.

1.6.3 BAFF Proteininin Bağlandığı TNF Reseptörleri ve Yapıları

TNF reseptörleri genellikle tip II Membran proteinleri şeklinde sınıflandırılırlar. Bu reseptörler, sistin amino asidince zengin domainler (CRD) den oluşan bir hücre dışı kısım, bir TRAF (TNF-Reseptör Assosiated Faktör) bağlayan domain ve bazı durumlarda bir ölüm domainlerinden oluşan hücre içi kısımlardan oluşmaktadır (Bodmer et al., 2002). Birbirine gerek yapısal, gerek fonksiyonel benzerlik gösteren BAFF ve APRIL proteinleri, TNF reseptör ailesinin birer üyesi olan B hücre Maturasyon Antijeni (BCMA) ve Transmembran Aktivatör ve CAML İnteraktör (TACI) reseptörlerine bağlanmaktadır (Şekil 1.6.) (Gross et al., 2000; Thompson et al., 2001).

APRIL molekülünden farklı olarak; BAFF proteini, BAFF-R reseptörüne özgül olarak bağlanabilmektedir (Thompson et al., 2001). TACI, BCMA, BAFF-R primer olarak B lenfosit membran yüzenlerine eksprese edilmektedirler. Ayrıca, BAFF

reseptörleri; tip III transmembran proteinleri olup, diğer TNF reseptörlerinden farklı olarak ölüm domaini olarak adlandırılan domaini içermezler (Bodmer et al., 2002).



Şekil 1.6. BAFF ve APRIL Proteinleri ve Reseptörleri (Mackay and Ambrose, 2003).

BCMA, TACI ve BAFF-R genleri sırası ile; 16p13.1, 17p11.1 ve 22q13.1–13.31 kromozomal lokasyonlarında bulunmakta ve kısmi dizin homolojisi göstermektedirler (GeneCard, 2006).

1.6.3.1 TACI Reseptörü

En uzun yapıya sahip BAFF reseptörü konumundaki TACI; iki CRD içeren bir ekstrasellüler bir parça ve CAML molekülü ile ilişkiye girebilen intrasellüler bir parça taşımaktadır. TACI reseptörü; hem BAFF, hemde APRIL proteine bağlama yeteneği göstermektedir. TACI'nin intrasellüler parçasının TRAF 2,5 ve 6'ı bağlayarak sinyal iletimi gerçekleştirdiği düşünülmektedir. TACI reseptörünün

aktive olmamış B hücreleri ile aktive olmuş T hücre membranları üzerine eksprese edildiği belirlenmiştir (von Bulow et al.,1997). Bunun yanı sıra, aktive edilmemiş T lenfositlerde de, basal bir TACI ekspresyonu söz konusudur (Xia et al., 2000).

1.6.3.2 BCMA Reseptörü

B Hücre Maturasyon Antijeni şeklinde adlandırılan BCMA reseptörü, T hücre lenfoma hastaları üzerinde yapılan kromozomal translokasyon araştırmaları sırasında bulunmuştur (Laabi et al.,1992). 50 amino asitten ve bir CRD'den oluşan hücre dışı bir parçaya sahiptir. BAFF'a oranla, APRIL bağlama kapasitesi daha yüksek bir reseptördür. BCMA temel olarak, B hücre yüzeyinde ekspres edilmektedir. Hücre yüzey ekspresyon miktarından daha yüksek bir miktarda B hücresi, perinükleer golgi benzeri hücre organelleri içerisinde sentezlendiği gözlemlenmiştir (Laabi et al., 1992). BCMA intrasellüler parçası TRAF 1, 2 ve 3 ile bağlanarak hücre içerisindeki birkaç sinyal ileti mekanizmasını aktive edebilmektedir (Hatzoglou et al., 2003).

1.6.3.3 BAFF-R Reseptörü

BAFF-R 70 amino asitlik bir hücre dışı parçaya sahiptir ve 4 sistin residüsü ile şimdiye kadar tanımlanmış en kısa CRD yi içermektedir. Buna karşın, sadece BAFF proteinine karşı yüksek bir afinite gösterir. BAFF-R; tüm splenik ve periferel B hücrelerinin yüzeylerinde ekspres edilmektedir. CD4+ T ve B hücre aktivasyonu sırasında BAFF-R ekspresyonu negatif regüle edilir. Buna karşın; anti-CD28 ve anti-CD3 antikorları ile aktive edilen T hücrelerinde, BAFF-R ekspresyonunun pozitif regüle edildiği, son yapılan çalışmalar ile gözlemlenmiştir. BAFF-R hücre içi sinyal ileti mekanizmasını aktive edebilmek için sadece, TRAF 3 bağlantı noktasına sahiptir (Thompson et al., 2001).

BCMA ve BAFF-R; göz önüne alındığında, BAFF reseptörlerinin memeli TNF reseptörlerinin genel karakteristiklerini taşıdıkları görülmektedir. Bu reseptörler, bir CRD taşıyan ekstrasellüler domain ve tip III transmembran protein yapısına sahiptirler.

1.6.4. BAFF Proteininin B Lenfosit Hayat Döngüsü, Olgunlaşması ve Aktivasyonundaki Rolü

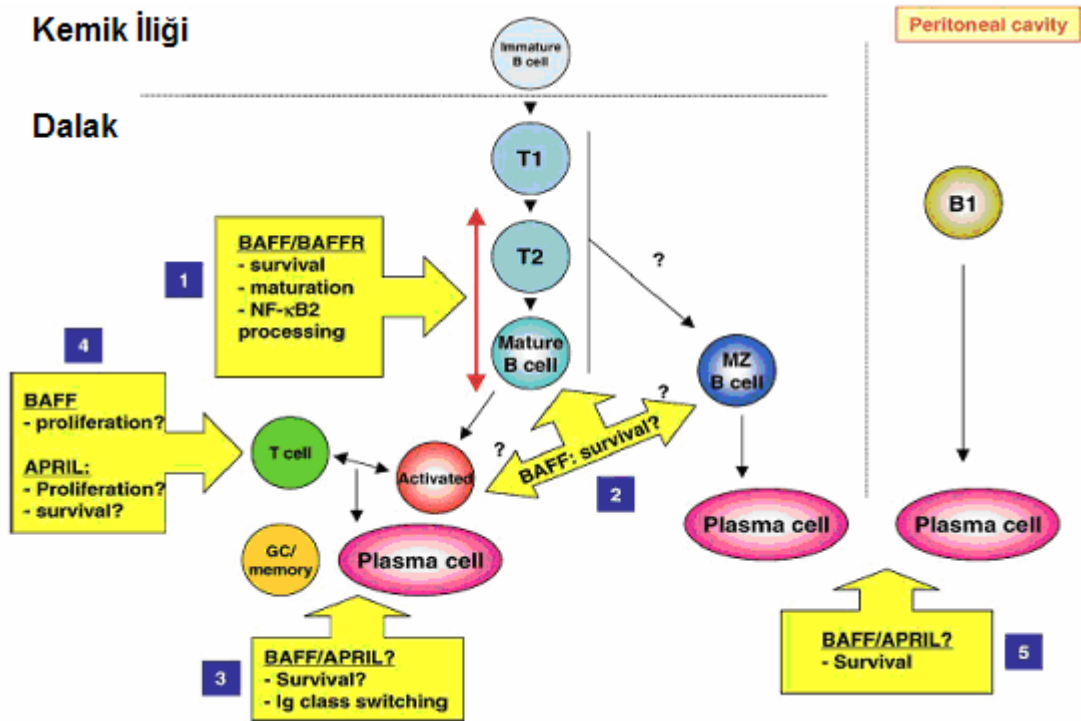
In vitro hücre kültür çalışmasında; rekombinant BAFF proteinin B lenfositlerin yaşam sürelerini uzatarak, onların maturasyon sırasında negatif seleksiyon ile ortadan kaldırılmalarını önledikleri belirlenmiştir (Batten et al., 2000; Do et al., 2000). Anti-BCMA enjekte edilen farelerde, B lenfosit hücrelerinin sekonder lenfoid organlarda tamamen ortadan kalktıkları gözlemlenmiştir. Buna karşın; BAFF Tg farelerde B lenfosit sayısında dramatik bir artışla birlikte, bu hücrelerde Bcl-2 onkojeninin ekspresyonunda bir değişim tespit edilmiştir (Thompson et al., 2001; Rolink et al., 2004). Bu yapılan çalışmalar; BAFF 'ın B lenfositlerin yaşamda kalmalarını sağlayan önemli bir faktör olduğunu gösterirken, aynı zamanda B lenfositlerin maturasyonlarında BAFF kontrolündeki mekanizmalara ihtiyacı olduğunu da ortaya koymaktadır. Bu bağlamda; BAFF^{-/-} fareler üzerinde yapılan çalışmalar, T2 B hücreleri ve daha ileri olgunlaşma aşamalarındaki B hücrelerini ortadan kalktığı gözlenmiştir (Schiemann et al., 2001). Bu transgenik farelerin sekonder lenfoid dokularında; Marjinal Zone (MZ) diye adlandırılan bölgenin ortadan kaybolması, T hücre bağımsız (TI) immün yanıt için BAFF/APRIL ligand/reseptör sisteminin kritik önemde olduğunu gösterir. Buna karşılık, bu farelerde B1 B lenfosit hücrelerinin bulunduğu bölgeler olan, sekonder organların “peritoneal cavite” sinin etkilenmemesi alternatif olgunlaşma ve yaşamda kalma sistemlerinin B lenfosit proliferasyonunda rol aldığını gösteren bir durumdur (Thompson et al., 2001).

BAFF^{-/-} transgenik fare ile BAFF-R^{-/-} (A/WySnJ) cinsi farede görülen B lenfositlerle ilgili semptomların aynı olması, BAFF BAFF-R reseptör ligand aksının B lenfosit yaşamı ve maturasyonunda temel mekanizmalardan biri olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, TACI ^{-/-} ve BCMA ^{-/-} transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin de B lenfosit hemoestazında rol oynadıklarını göstermiştir (Thompson et al., 2001).

BAFF proteininin bir diğer biyolojik fonksiyonu da, B hücrelerinin BCR reseptörü tarafından aktivasyonunun düzenlenmesidir. Bu düzenlenme; BAFF

proteininin B lenfosit proliferasyonu üzerindeki etkiden daha fazla etkilidir ki; bu etki sayesinde B lenfosit sayısında daha fazla bir artış görülür. Aktivasyonun daha sonraki aşamalarında salgılanan IL-10 ve PIM-2 protooncogeni BAFF kostimulatörü gibi çalışarak, B hücre klonlarının proliferasyonunu stimule ederler (Xu et al., 2002).

Yapılan bir başka çalışmada; BAFF ve APRIL moleküllerinin IL-10 ve TGF β varlığında immünglobulin (Ig) class-switch DNA rekombinasyonunu (CSR) stimule ettiği gösterilmiştir (Litinskiy et al., 2002). Bu stimülasyon, Ig G ve Ig A salgılayabilecek plazma hücrelerinin BAFF ve/veya APRIL'e cevap olarak negatif seleksiyona uğramadan proliferate edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca BAFF; aktive olmuş B hafıza hücrelerinin yaşam sürelerini uzatarak da, Ig sentezleyen plazma hücrelerinin oluşumunu düzenlemektedir (Litinskiy et al., 2002). Sonuç olarak; BAFF / APRIL sisteminin biyolojik fonksiyon olarak humoral immün sistem içerisinde önemli fonksiyonları vardır. Şekil 1.10'da bu biyolojik fonksiyonlar şematize edilerek özetlenmiştir.



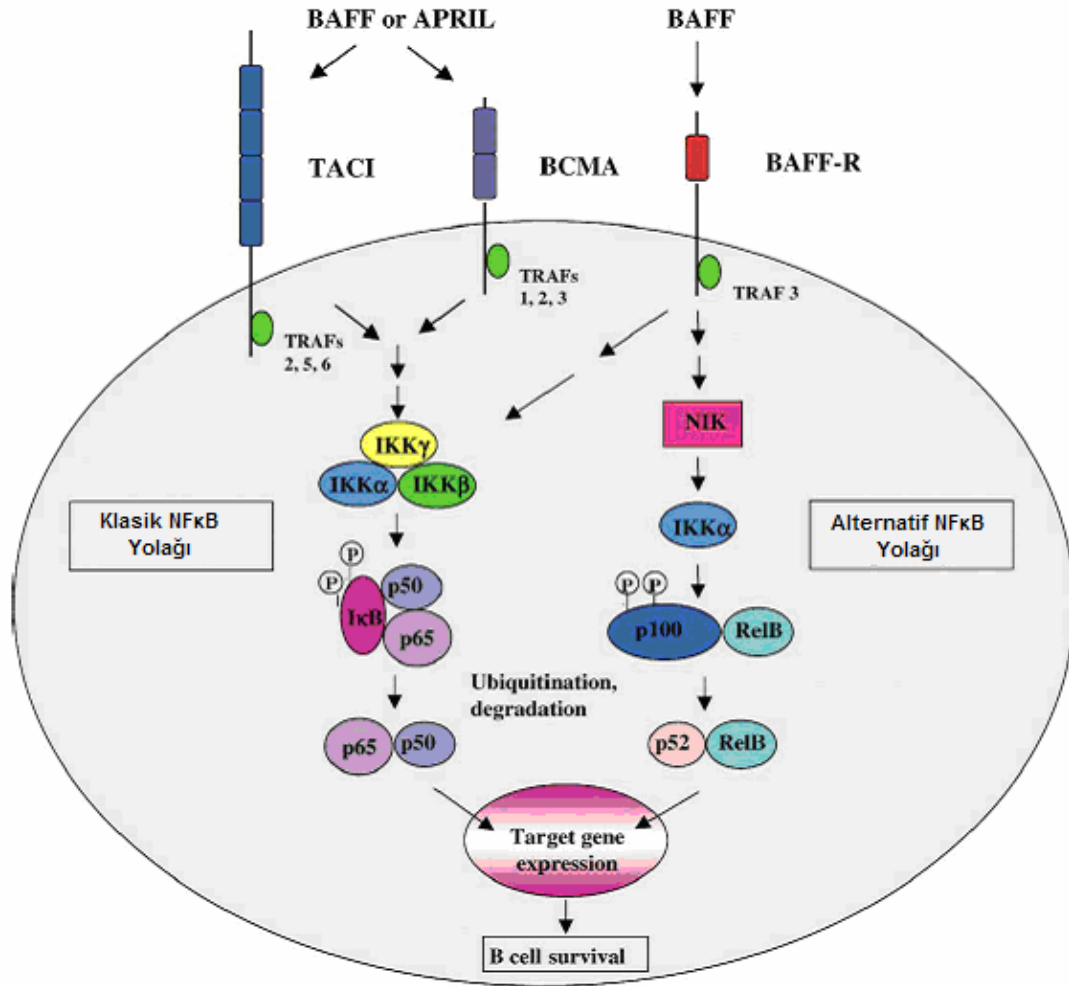
Şekil 1.7. BAFF ve APRIL Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları (Mackay and Ambrose, 2003).

1.6.5. BAFF Proteininin Sinyal İleti Mekanizması

BAFF sinyal iletimi oldukça karışıktır ve detayları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hangi BAFF reseptörlerinin, gelişimin hangi aşamalarında B hücre yüzeyinde bulunduklarının karşılaştırmalı olarak çalışılmamıştır. Bu durum, BAFF uyarımı ile gözlemlenen olguların, hangi sinyal mekanizmalarını nasıl etkilediğinin tüm açıklığı ile sergilenememesinin nedenlerindendir. Bununla birlikte; B lenfositlerin yaşam süresinin uzamasını sağlayan olayın, BAFF uyarımına cevap olarak, anti-apoptotik faktörler olan A1 ve Bcl-2 olduğu düşünülmektedir (Mackay, 1999). Ayrıca, pro-apoptotik bir gen olan BAX geninin, BAFF uyarımı ile negatif regüle edilmektedir (Do et al., 2000). BAFF proteinin kullandığı sinyal ileti mekanizması, NFκB sinyal ileti mekanizmasıdır. TACI ve BCMA reseptörleri, klasik NFκB sinyal mekanizmasını aktive edebilmelerine rağmen, B lenfosit yaşamını uzatan sinyalin, alternatif NFκB sinyal mekanizmasını aktive edebilen BAFF-R tarafından başlanması söz konusudur. BAFF-R'in klasik NFκB sinyal mekanizmasını da aktive ettiği düşünülmekle birlikte, bu durum tam olarak ispat edilememiştir (Mackay and Ambrose, 2003). BAFF reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmasının ayrıntılı şeması, Şekil 1.8'de sunulmaktadır.

BAFF-R in alternatif NFκB sinyal mekanizmasının aktivasyonu, p100 (NFκB-2) molekülünün proteolitik bir reaksiyonla p52 molekülüne dönüşümü ve p52 molekülünün Relb molekülü ile kompleks oluşturması, hücre çekirdeğine translokasyonu ve yönlendirilmiş gen ekspresyonunu başarması ile sağlanır. NFκB-2 (p100)'ın p52'ye proteolitik dönüşümü TRAF 3'ün aktivasyonu ile IKKα ve NIK tarafından başlanır (Coope et al., 2002; Xiao et al., 2001). Alternatif NFκB sinyal mekanizmasını aktive edebilen LTβ ve CD40 adlı TNF reseptörleri vardır ki; bunlar da taşıdıkları TRAF3 aktive edici intrasellüler parça sayesinde aktivasyonu başarmaktadırlar (Van Arsdale et al., 1997). Bu reseptörler de BAFF-R içinde düşünüldü gibi aynı zamanda, klasik NFκB sinyal mekanizmasını aktive edebilmektedir.

B hücrelerinin yaşamı üzerine etkili olacak, BAFF-R aracılıklı pozitif ya da TACI aracılıklı negatif bir sinyalin etkili olması, B hücresi üzerinde bulunan bu reseptörlerin zamana bağlı ekspresyonuna bağlıdır (Mackay, 1999).



Şekil 1.8. BAFF ve APRIL Proteinlerinin Sinyal İleti Mekanizması (Mackay and Ambrose, 2003).

1.6.6. BAFF Proteinin Hastalıklardaki Rolü

1.6.6.1. Otoimmün Hastalıklarda BAFF Proteinin Önemi

Metabolizmayı otoimmün hastalıklardan koruyan immün tolerans sistemi kısmi olarak, lenfosit yaşam süresinin kontrolü ile düzenlenir. Bcl-2 geni bakımından transgenik farelerde ortaya konduğu gibi, lenfosit yaşamının yanlış regüle edilmesi,

otoimmün hastalıklara neden olur (Strasser et al.,1991; Mackay, 1999). Bunun benzeri olarak başka bir çalışmada; artmış BAFF ekspresyonunun transgenik fareler üzerindeki etkisi ile; artmış B lenfosit sayısı, anti-dsDNA, ANA otoantikörleri ve Romatoid Faktör sentezine paralel otoimmün belirtiler tespit edilmiştir. Ayrıca, BAFF Tg farelerde böbrek yetmezliğine neden olan glomerulonefrit sendromunda tespit edilmiştir (Khare et al., 2000). Bu nedenlerle, BAFF transgenik fareler SLE hastalığına benzer otoimmün hastalık belirtileri oluşturmaktadır. BAFF knockout ve transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar (Mackay and Ambrose, 2003) sonucunda; BAFF reseptör ligand sisteminin B lenfosit gelişimi ve yaşamı üzerindeki etkisinin kemik iliğindeki gelişim süreci sırasında değil, daha çok lenfositlerin periferik lenfoid organlardaki gelişimleri sırasında etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Kemik iliğinden ikincil lenfoid organlara ulaşan B lenfosit hücrelerinin, olgun B hücrelerine dönüşüm için geçirdikleri iki aşama vardır. Bunlar, T1 ve T2 olarak adlandırılan transisyonal olgunlaşma aşamalarıdır. Bu aşamalar, immün toleransın olduğu önemli kontrol noktalarından biridir. Bu esnada; olgunlaşmamış B lenfositler, BCR tarafından gelen öldürücü sinyallere oldukça duyarlıdır ve otoreaktif B lenfositlerin büyük bir kısmı elimine edilir. BAFF transgenetik farelerde, artmış BAFF düzeyine bağlı olarak periferik sekonder organlardaki T2 maturasyon aşamasındaki hücrelerde bir artış görülür ki, bu da otoreaktif B lenfositlerin bu aşamaya kadar elimine edilemediği anlamına gelir (Nemazee et al., 2000). Otoreaktif B lenfositlerin periferdeki eliminasyonunu sağlayan bir diğer mekanizma ise, az miktardaki otoantijen ve BCR reseptörüne sahip olan lenfositler arasında “Anergy” dir. BCR reseptörünün otoantijenler tarafından aktive edilerek olgunlaşmamış otoreaktif B lenfositler üzerinde bir eliminasyonu stimule etmeleri, anergy olarak adlandırılır. Bu Anergy sinyali, BAFF Tg farelerde kısa olarak düzenlenmiştir. Bu noktada; BAFF’ın bu sinyali bloke etmediği belirlense de, azalmış olan anergy etkisinin nedeni tam olarak açıklanamamıştır (Batten et al., 2000).

Bunların yanı sıra; SLE, Sjögren’s Sendromu (SS) ve Romatoid Arthritis hastaları ile yapılan çalışmalarda, hastalık ile yüksek BAFF ekspresyonu arasında bir bağlantı bulunmuştur (Groom et al., 2002). Bu hastalıklarda BAFF

disregülasyonunun nedeni tam olarak anlaşılamamaktadır. Bu disregulasyon ile BAFF geninin CDS ve/veya promotor bölgesinde gözlemlenebilecek polimorfizm arasında bugüne kadar bir ilişki tespit edilememiştir (Kawasaki et al., 2001).

Otoimmün hastalıkların patofizyolojisinde ve hastalığın oluşum mekanizmalarında rol oynadığı düşünülen BAFF proteini, bu nedenlerden dolayı son yıllarda, otoimmün hastalıkların tedavisi açısından hedef protein olarak düşünülmektedir.

1.6.6.2 Kanser Hastalıklarında BAFF'ın Rolü

Son yıllarda lenfomalı hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, lenfoid malignitenin gelişiminde BAFF'ın rol oynadığı kabul edilmiştir. Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda (NHL) serum BAFF seviyesi, normal hastalara oranla oldukça yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda, NHL kaynaklı B hücrelerinin yaşam sürelerinin BAFF tarafından artırıldığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar, B hücre kökenli Lenfoblastik Lösemi (B-CLL) hastalarında da izlenmiştir. Tıpkı NHL de olduğu gibi B-CLL'de de B hücreleri, BAFF tarafından apoptozisten korunarak tümör gelişimini sağlamaktadırlar (Claudio et al., 2002). Multiple myeloma hastaları üzerinde yapılan microarray çalışmalarında BAFF ve onun reseptörlerinden biri olan BCMA'da anormal ekspresyonun olduğu gösterilmiştir. Farelerde Murin Lökemi hastalığında, hastalık etkeni olan retrovirüsün kromozom 15'e bütünleşmesi, BAFF-R proteininin hatalı ekspresyonuna neden olmaktadır. BAFF-R geninin lokalize olduğu 13'uncu kromozom bölgesinde folikular lenfomalı hastalarda, bir amplifikasyon tespit edilmiştir (Hentges et al., 2002).

Yukarıda sayılan patofizyolojik olgular nedeniyle, lenfoid hastalıkların gelişiminde etkisi olduğu düşünülen BAFF proteini ve reseptörleri, bu kanser türlerinin tedavisinde bir hedef olarak düşünülmektedir.

1.6.6.3 İnfeksiyon Hastalıklarında BAFF Proteinin Rolü

Yapılan bir araştırmada (Shu et al., 1999), monosit ve dentritik hücrelerde ki BAFF ekspresyonunun IFN γ tarafından çok sıkı regüle edildiği belirlenmiştir. Aynı şekilde IL-10' inde, makrofajlar üzerinde bu etkisi bulunmaktadır. IL-10 ile IFN γ infeksiyon ve inflamasyonda cevap olarak oluşan sitokinlerdir (Shu et al., 1999; Nardelli et al., 2000; Litinskiy et al., 2002). Romatoid Artritli (RA) hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, birçok hastanın hastalık öncesi uzun süreli kronik infeksiyonlar geçirmiş olduğunun belirlenmesi ile bazı infeksiyonlar ve otoimmün hastalıklar arasında bir bağlantının olduğu düşünülmüştür (Rose, 1999). Bu açıdan; Romatoid inflamasyonun olduğu eklemlerdeki BAFF seviyesinin, serumdaki BAFF seviyesinden daha yüksek olduğunun belirlenmesi, ana BAFF ekspresyon kaynağının infekte olmuş dokulardan kaynaklandığını göstermektedir. Kronik infeksiyonların yol açtığı BAFF ekspresyonundaki anomali sonucunda kanda artan BAFF proteinin, B lenfosit ve immün tolerans üzerinde etki göstererek, otoimmün hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (Rose, 1998; He et al., 2003).

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; İTP hastalığının, sadece sanıldığı gibi otoantikör aracılıklı trombosit yıkım mekanizması ile değil aynı zamanda, T hücre aracılıklı sitotoksik immün cevap ile trombosit yıkım mekanizmasının da içinde bulunduğu bir dizi birbirinden farklı patogeneze mekanizmasının beraber çalıştığı, heterojen bir hastalık grubu olduğu değerlendirilmektedir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, microarray tekniği kullanılarak aktif İTP'li hastalardan elde edilen CD3+ T hücreleri, bir grup sitotoksik gen açısından analiz edilmiştir ve IFN γ , Apo-1/Fas, IL-2 β reseptör, granzyme A ve B gibi, Th1 hücre aracılıklı immün cevap sitokin profilini gösteren bir gen ekspresyon artışı tespit edilmiştir (Olsson et al., 2003). Yine bu microarray çalışması ile remisyon fazındaki İTP'li hastalarda, CD3+ T hücrelerinin KIR reseptör ailesinin bazı üyeleri olan genlerde artmış bir ekspresyon gözlemlenmiştir. Sitotoksik T hücrelerinin ve NK hücrelerinin negatif düzenleyici olan KIR reseptör ailesinin bu üyelerinin, T hücre aracılıklı sitotoksik immün reaksiyonu bloke ederek, trombosit yıkımını engellediği ve hastalığı remisyon fazına geriletmediği bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Hücre aracılıklı immün cevap mekanizmasının; kronik İTP'li hastalarda trombosit yıkımında rol alan efektör bir mekanizma olduğu ortaya konmuştur (Zhang et al., 2006). İTP hastalarından izole edilen CD8+ T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde flow cytometry ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak; TNF- α , FasL, perforin, granzyme B analiz edilmiş ve ekspresyonlarında bir değişim tespit edilmiştir. Özellikle apoptosis ve perforin/granzyme B aracılıklı sitotoksik etkinin, kronik İTP hastalarında sitotoksik T lenfositleri aktive ettiği, aynı çalışmada rapor edilmiştir.

Otoimmün hastalıklarda BAFF proteinin rolünü araştıran birçok araştırmadan bir tanesi de; primer Sjögren's sendromu (pSS) adı verilen hastalık ile, BAFF ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmadır (İttah et al., 2006). Bu bağlamda qRT-PCR, ELISA ve immüno-histokimyasal tekniklerin kullanıldığı çalışmalar ile tükürük bezlerinde epitel hücreler tarafından, BAFF ekspresyonunun pSS'li hastalarda interferon alfa ve gamma stimülasyonu ile uyarımı ile 10 ile 20 kat arttığı

gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ile, otoimmün hastalıklarda hedef organ ya da dokudaki değişimlerin önemi ortaya konmuştur (Ittah et al., 2006).

Kuwana et al. (2001) tarafından yapılan araştırma ile otoreaktif CD4⁺ T hücrelerinin trombosit membranında bulunan glikoprotein IIa18–259 ve IIb22–262 epitoplarını tanıyarak, bunlara karşı otoantikor oluşumu için B lenfositleri stimüle ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla, İTP hastalığında antikor bağımlı immün cevap ile oluşan efektör mekanizmanın aynı zamanda, CD4⁺ T hücreleri tarafından kostimüle edildiği ortaya konmuştur.

Otoimmün hastalıklarda; B lenfositlerin gerek antikor üretimi, gerekse de inflamasyonda önemli roller üstlenmesi sebebiyle, tedavi olarak lenfositlerin baskılanması önemli bir strateji oluşturur. Bu baskılama için; BAFF ve onun homologu olan APRIL proteinleri, B lenfosit proliferasyonu ve yaşamda kalmasını sağlayan önemli faktör olarak hedef moleküller olarak algılanabilmektedir. Ramanujam et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, murine SLE hastalığına sahip farelerde BAFF-R-Ig ve TACI-Ig antidozları ile BAFF ve APRIL proteinlerinin etkisi bloke edilerek, bunların hastalık üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Bu çalışmada; B hücreleri üzerindeki baskılamaların, aynı zamanda T hücre aktivasyonunu ve dentritik hücre faaliyetlerini de ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. SLE hastalığının en önemli belirteci olan anti-dsDNA Ig G antikorunun üretimini de bloke etmiştir. Bu bağlamda; BAFF ve APRIL reseptör blokajı, otoimmün ve malign hastalıkların tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak ortaya konmuştur (Ramanujam et al., 2005).

Antikor üretimini pozitif düzenleyen BAFF proteini; bunu başarmak için G₀/G₁ hücre yaşam döngüsü aşamasında bloke edilmiş olan naif B lenfositlerin, G₁ aşamasına geçmesini sağlar. Huang et al. (2004) tarafından yapılan çalışma; BAFF proteininin, lenfositlerin G₁ aşamasına geçebilmeleri için gereken sinyali tek başına oluşturabildiği gösterirken, S fazı için gerekli olan indüksiyon için de, BCR ile beraber çalıştığını ortaya koymuştur.

Dendritik hücreler tarafından üretilen BAFF proteinin T hücre kostimülasyonunda görev aldığı tespit edilmiş, gerek APC T hücre interaksionunda APC'ler tarafından üretilen, gerekse de T lenfositler tarafından otokrin olarak üretilen az miktardaki BAFF proteinin T hücre kostimülasyonunda görev aldığı gözlemlenmiştir (Bertrand et al., 2004).

Matsushita et al. (2006) tarafından 21 hastadan tekrarlayan aralıklarla alınan 131 serum örneği üzerinde yapılan ELISA çalışmasıyla; otoimmün bir hastalık olan sistemik sklerosis hastalığına BAFF ve onun sinyal mekanizmasındaki bir bozukluğun, B lenfosit anomalisine yol açarak neden olduğu tespit edilmiştir.

Kollegen ile uyarılmış Romatoid Artritisli (RA) fareler üzerinde yapılan çalışmalar, BAFF proteininin dentritik hücreler ve makrofajlardan artmış miktarlarda salınımının, RA patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, anti-kollegen otoantikor ile BAFF serum miktarı arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Zhang et al., 2005).

84 kronik İTP hastası ve 56 kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada, TNF- α (-238 G/A ve -308 G/A), TNF- β (+252 G/A) ve IL-1 β (-551 C/T ve +3053 T/C) SNP ile İTP arasındaki bağlantı araştırılmış, özellikle TNF- β (+252 G/A) polimorfizmi ile kronik İTP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı tespit edilmiştir (Satoh et al., 2004).

Sjögren's sendromlu hastaların BAFF geni ve onun promotor dizisinin analizi ile BAFF promotorunun -871 pozisyonunda bir T/C polimorfizmi tespit edilmiştir. Buna göre TT ve TC genotipine sahip allelleri taşıyan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı artan bir serum BAFF düzeyi tespit edilmiştir. Fakat, sitoplazmadaki mRNA düzeyi ile bu polimorfizm arasında bir korelasyon tespit edilememiştir. Bu bağlamda; bu polimorfizmin hastalığa bir eğilim sağlamadığı, yine aynı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Gottenberg et al., 2006).

221 SLE ve 154 RA hastası üzerinde yapılan çalışmada (Kawasaki et al., 2001), BAFF geni ve onun promotor bölgesinin DNA dizi analizi yapılmış ve promotor bölgede 4 SNP, intron I'de 1 SNP ve kodlayan bölgede ise; Ala105Thr aminoasit değişimine neden olan 1 SNP tespit edilmiştir. Bu polimorfizmlerin SLE ya da RA hastalığına bir yatkınlık sağladığı yönünde bir kanıt bulunamamıştır. Buna rağmen, -871 TT genotipine sahip hastaların monositlerinde BAFF mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır, aynı zamanda bu hastalar arasında anti-Sm otoantikör görülme sıklığı göreceli olarak yüksektir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi yüksek olmasa da, RA hastalarında 105Thr allelinin daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir.

Yukarıda sıralanan şimdiye kadar yapılmış olan araştırmalarda, BAFF proteini ile birkaç otoimmün hastalık arasındaki ilişki araştırılmış olmasına rağmen, İTP hastalığı ile BAFF proteini arasındaki ilişkiyi araştırarak bir yayına rastlanamamıştır. Bu bağlamda, planlanmış olan bu çalışma literatürde ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Yukarıda anlatılan otoimmün hastalıklarda belirlenen, BAFF promotorundaki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP), promotor üzerindeki fonksiyonel etkileri, ne teorik ne de deneysel çalışmalar ile araştırılmıştır. Bu bağlamda; İTP hastalığında BAFF geni ve promotorunda meydana gelebilecek olası değişiklikler ve onların promotor üzerinde oluşturabileceği fonksiyonel değişimlerin teorik analizi, bu çalışma kapsamında literatüre eklenecek bir yenilik olarak planlanmıştır.

3.ÇALIŞMANIN AMACI

SLE, RA ve pSS gibi otoimmün hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalar ışığında; İTP hastalarının serum BAFF düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması, hastalığın tedavi ve prognozu aşamasında BAFF serum düzeyindeki değişimlerin saptanması ve bu bağlamda, BAFF proteininin İTP hastalığında oynadığı rolün tespiti, bu tez çalışmasında amaç olarak öngörüldü.

İTP hastalığında, BAFF geni ve onun promotor bölgesinde karşılaşılabilecek olası bir genetik değişim için DNA dizin analizi uygulanması ve bu değişimlerin fonksiyonel etkilerinin teorik analizi tezin kapsamı dahilinde tutuldu. Bu bağlamda; İTP hastalığında BAFF geni ve promotorunda meydana gelebilecek olası değişiklikler ve onların promotor üzerinde oluşturabileceği fonksiyonel değişimlerin teorik analizinin, literatüre eklenebilecek yeni bir bilgi olabileceği düşünüldü. İTP ve BAFF ilişkisi ilk defa bu çalışmayla ortaya konduğundan, ilgili literatüre önemli katkılarda bulunmak hedeflendi.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. Yöntem

4.1.1 Örnek Grubunun Oluşturulması ve Test Edilecek Materyal Toplanması

Bu araştırma; Charite Tıp Üniversitesi, DRK Klinikum Westend Kampusündeki, Transfüzyon Enstitüsüne bağlı laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

Bu çalışma bünyesinde kullanılan tüm kan örnekleri; 2002–2006 yılları arasında, Berlin Charite Tıp Üniversitesi, Transfüzyon Enstitüsünden Profesör Dr. Abdulgabar Salama'nın tıbbi kontrolü altında olan hastalardan alındı. Hastalığının prognozunu gözlemlemek ve ilaç düzenlemelerini yapmak üzere, hastalar belli aralıklarla muayeneye çağırıldı. Hastalığın seyri ile test edilen parametreler arasındaki ilişkiyi tespit etmek için, aynı hastalardan farklı zaman ve farklı ilaç tedavileri altındayken kan örnekleri toplandı. Toplanan materyaller; hasta takip dosyaları üzerinde yapılan, retrospektif çalışmalarla sınıflandırılıp, her test için istatistiksel değerlendirilmeye zarar verebilecek örnekler çalışmadan çıkarıldı. Örnek olarak; kronik İTP teşhisi konulan bir hastanın çeşitli zaman aralıklarında alınan kan örneklerinden biri ya da bir kaçı; yapılan kan sayımı sonucuna göre, trombosit sayısı açısından remisyon fazında ise, yapılacak olan testin niteliğine göre sınıflandırıldı ya da çıkarıldı.

Analizde kullanılacak kan örnekleri, test sonuçlarını etkileyebilecek preanalitik önlemler alınarak gerekli koşullarda saklandı.

4.1.2 Kan Sayımı (Hemogram)

Hastalardan 5 ml kan örneği K₃-EDTA'lı tüp içerisine alınarak, Abbott CELL-DYN 3700 marka Hemogram otoanalizatöründe analiz edildi. Analiz sonucunda, 25 parametrelilik kan sayım değerleri kaydedildi. Analizi yapılan parametreler arasından; Bazofil, Eozinofil, Monosit sayısı ve oranı ile toplam Lökosit, eritrosit, trombosit sayısı ve çapı, hematokrit, hemogloblin değerleri, gerek hastanın klinik durumunun gerekse bu parametrelerin araştırılan BAFF proteini ile ilişkisini tespit etmek amacıyla kaydedildi.

4.1.3 Serum İzolasyonu

5 ml hasta kanı hiçbir anti-koagulatör barındırmayan steril cam tüpe alınarak, pıhtılaşması sonrasında, santrifüjde 10 dakika 1800 rpm'de santrifüj edildikten sonra, ayrıışan serum 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. İzole edilen serumlar numaralandırılarak analizler yapılma kadar -20°C depolandı.

4.1.4 DNA İzolasyonu

Hastalardan K₃-EDTA'lı tüp içerisine alınan 3 ml kandan DNA izolatörü (Geno MTM-6 Geno Vision) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA kalitesi, spektrofotometre (BioRad Smartspec Plus) kullanılarak test edildi. Fotometrik ölçüm üç kere tekrarlanarak, aritmetik ortalama alındı.

4.1.5 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hastalardan sitrat anti-koagulatör içeren 5 ml kan alındı. Sitratlı kandan Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche) kullanılarak aşağıda belirtilen Protokol A ile lökositler izole edildi ve bunlardan da High Pure RNA Isolation Kiti (Roche) ile aşağıdaki Protokol B kullanılarak RNA izole edildi.

Protokol A

- 1,5'lik eppendorf tüpüne 1 ml “ Red Blood Cell Lysis Buffer” eklendi.
- Üzerine 500 µl tam kan eklenerek 10 dakika çevirerek bekletildi.
- Brinkman Eppendorf 5414C marka santrifüjde 5 dakika 9000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant pipet yardımı ile tüpten uzaklaştırıldı.
- Bu işlemler, pelet üzerindeki eritrosit kontaminasyonunu ortadan kaldırıncaya kadar tekrarlandı.
- Eritrosit kontaminasyonu giderilen lökosit peleti, 200 µl PBS de çözülerek Protokol B’ye geçildi.

Protokol B;

- 200 µl lökosit-PBS çözeltisine 400 µl Lysis/-Binding Buffer eklendi.
- 15 saniye Vortex ile karıştırıldıktan sonra, polipropilen filtreli tüpe aktarıldı ve 15 saniye 8000 X g’de santrifüj edildi. Bu şekilde binding solüsyonu ile bağlanmış bulunan nükleik asit molekülleri, tüp içerisindeki filtre üzerinde toplandı.
- 10 µl DNase I ve 90 µl “DNase Incubation Buffer” ile hazırlanan solüsyon, tüp içerisindeki filtre üzerine pipetlenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamada, filtre içerisindeki DNA’lar DNase I ile enzimatik olarak parçalandı.
- İnkübasyon sonrasında 500 µl “Wash Buffer I “ eklenen filtreli tüp 8000 X g de 15 saniye santrifüj edildi.

- “Wash Buffer I” ile yıkanan tüp önce 500 µl “ Wash Buffer II” ile 8000 X g’de, sonra da 200 µl eklenerek 13 000 X g’de santrifüj edildi.

- Mikrosantrifüj tüpündeki polipropilen filtrede bağlı bulunan RNA’lar 70 µl “Elution Buffer” ile çözülerek, 13 000 X g’de santrifüj edilerek 1,5 ml’lik eppendorf tüp içerisinde toplandı.

İzole edilen RNA’ların spektrofotometrik miktar tayini yapıldı. Hastalardan değişik zaman aralıkları ile alınan RNA’lar, Serum ID ile aynı numaralama sistemine göre numaralandırıldı. İzole edilen RNA’lar -80 derecede çalışılncaya kadar muhafaza edildi.

High Pure RNA Isolation Kitinde kullanılan solüsyonların fonksiyonları ve içerikleri;

1- Lysis Binding /Buffer; Lökositlerin parçalanması ve Nükleik asitlerin bağlanması amacıyla kullanılır. → 25 ml toplam hacim içerisinde 4,5 M guadinin-HCL + 50 mM Tris-HCL + %30 Triton X-100(w/v) pH 6,6 (25 °C)’dir.

2- DNase I Incubation Buffer; DNase I enziminin çalışabileceği optimal tampon çözelti → 10 ml toplam hacim içerisinde 1 M NaCl + 20 mM Tris-HCL + 10 mM MnCl₂ + pH 7,0 (20 °C)’dir.

3- Wash Buffer I; Protein ve DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak için kullanılır. → 53 ml toplam hacim içerisinde 5 M guadinin -HCL + 20 mM Tris-HCL pH 6,6 (25 °C) (20 ml etanol eklenmesi sonrası son konsantrasyon olarak).

4- Wash Buffer II; Protein ve DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak için kullanılır. → 50 ml toplam hacim içerisinde 10 mM NaCl + 2 M Tris-HCL pH 7,5 (25 °C) (40ml Etanol eklendikten sonraki son konsantrasyon).

5- Elution Buffer; Polipropilen filtreye bağlı bulunan RNA'nın buradan çözülmesi ve final solüsyona karışmasını sağlar.

4.1.6 cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için, RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre kullanıldı.

Buz üzerine yerleştirilmiş bir PCR reaksiyon tüpüne;

- 50 ng template RNA
- 1 µl oligo(dT)₁₈ primer (0,5 µg/ µl)
- 12 µl ye toplam hacime DEPC-H₂O tamamlandı.

Bu karışım, Thermal Cycler'da (BioRad iCycler) 70 °C'da 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra buz üzerine alındı. Aşağıdaki komponentler reaksiyon tüpüne eklendi.

- 4 µl 5 X Reaction Buffer
- 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20 u/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP

Bu komponentlerin eklenmesinden sonra Thermocycler'a yerleştirilen tüp, 37°C de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 1 µl RevertAidTM H Minus M-MuLV enzimi eklenerek 42°C de 60 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, 70°C de 10 dakikalık son bir aşama ile sonlandırıldı.

4.1.7 Bioinformatik Yöntem ve PCR Primer Dizaynı

Bu tez kapsamında, BAFF geninin protein kodlayan (CDS) ve promotor dizilerinde olası mutasyonları saptamak amacıyla PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere, primerler PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>) adlı açık kaynak kodlu bioinformatik yazılım ile tasarlandı.

BAFF mRNA dizisi için, Genbank AF116456 kodlu dizi referans olarak kullanıldı. 1052 nükleotid uzunluğunda olan bu BAFF mRNA dizisinin; 119–976 nükleotidleri arası translasyon esnasında protein olarak ifade edilirken, 1–118 ve 977–1052 arasındaki nükleotidler protein olarak ifade edilmemektedirler (NCBI).

UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) ve NCBI'nin (<http://www.ncbi.nih.gov>) Blat ve Blast programlarına bu referans dizinin verilmesi ile hem BAFF geninin intron-exon yapısı, hem de kromozomal lokalizasyonu tespit edildi.

Tablo 4.1'de, proje kapsamında PerlPrimer programı ile dizayn edilerek PCR reaksiyonlarında kullanılan BAFF sense ve anti-sense primerlerinin listesi sunulmaktadır.

BAFF promotor dizisinin analizi için kullanılan primer seti ise; Bing et al. (2005)'de belirtildiği gibi alındı. Bu primer seti, BAFF geninin 1072 baz uzunluğundaki regülatif DNA dizisini çoğaltmaktadır.

1072 nükleotidlik genomik DNA parçasının regülatif özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Genbank databankından kopyalanan bu DNA dizisinin, IFTI-MIRAGE (www.ifti.org) web databankının sunduğu “transkripsiyon faktör (TF) bağlantı dizi” analizi yapıldı. Promotor üzerindeki bu TF bağlantı noktaları yazılım aracılığı ile matematiksel olarak hesaplanan DNA dizileri olup, kromozomal yapının kompleksliği nedeni ile gerçek anlamda aktif bağlantı noktaları olmayabilir. Bu TF

bağlanma dizilerinin gerçekte işlerliğini sınama, EMSA yöntemi ile protein-DNA interaksiyonunun *in vitro* gösterimi ile mümkündür.

Tablo 4.1. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Listesi

Adı	Dizi	A	C	G	T	Mer	GC(%)	Tm(°C)
BAFF 318rev	GTA GAA AGA CAC CAC CGT GAG GCA	9	6	7	2	24	54	74
BAFF 20for	TGC ACG CAG GAC ATC AAC AAA CAC	10	8	4	2	24	50	72
BAFF 479for	AAC AGG AAA TGA TCC ATT CCC	8	6	3	4	21	43	60
BAFF 10for	CTG CCA TGT AGT GCA CGC	3	6	5	4	18	61	58
BAFF 1019rev	CAG AGA AAG GGA GGA AAA TAG C	11	2	8	1	22	45	64
BAFF 298for	CCT CAC GGT GGT GTC TTT CT	1	6	5	8	20	55	62
BAFF 790rev	CAA TTC ATC CCC AAA GAC ATG GAC	9	8	3	4	24	46	70
BAFF 26 for	CAG GAC ATC AAC AAA CAC AG	10	6	3	1	20	45	58
BAFF 1026 rev	TAG AGG TAC AGA GAA AGG GA	9	1	8	2	20	45	58
BAFF Prmt for	CAC AGG TCC ACC AAG TCA ACA ACA GA	11	9	4	2	26	50	78
BAFF Prmt rev	ATC ACT ACT TGA ACT TTG AAG GTT GG	7	4	6	9	26	38	72

4.1.8 Gradient PCR

BAFF promotor 1072 nükleotidlik DNA fragmentini genomik DNA'dan PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için BAFF Prmt for ve rev primerleri (Bkz Tablo 4.1) Invitak GmbH (Germany) firmasından temin edildi. Primerlerin en uygun annealing temperaturünü bulmak amacıyla, "Thermal Cycler" ile (BioRad iCycler) 53–60 °C sıcaklık gradientinde, Gradient PCR uygulandı. PCR programı aşağıdaki gibi programlandı. Tablo 4.2'de Gradient PCR reaksiyon bileşenleri sunulmaktadır.

95 °C	60 sn.	1	döngü
95 °C	30 sn.	34	döngü
53–60 °C	35 sn.		
72 °C	30 sn.		
95 °C	10 min.	1	döngü

Tablo 4.2. BAFF Promotor Fragmenti Gradient PCR Reaksiyon Bileşenleri

PCR reaksiyon Komponentleri	1 Reaksiyon 50µl toplam hacim	
10 X Reaction Buffer	5	µl
25mM MgCl ₂	3	µl
DMSO	2,5	µl
0,5 mM dNTP	25	µl
Forward Primer (BAFF prmt for)	1	µl
Reverse Primer (BAFF prmt rev)	1	µl
Template DNA (200 ng genomik DNA)	1,98	µl
Taq DNA polimeraz (InviTaq)	0,6	µl
Deiyonize H ₂ O	9,92	µl
Toplam Hacim	50,0	µl

BAFF cDNA üzerinden yapılan BAFF PCR reaksiyonlarında kullanılan BAFF 26 for ve BAFF 1026 rev primer seti için de yukarıdaki Gradient PCR protokolü uygulandı .

4.1.9 BAFF Promotor PCR

1072 bazçifti uzunluğundaki BAFF promotor dizisi, hasta ve kontrol gruplarından BAFF prmt for ve BAFF prmt rev yardımı ile çoğaltıldı ve % 0,8 agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi. PCR ürünlerinin jel üzerinde kontrolü için 14 kb'lık Marker DNA kullanıldı. Etidyum bromür ile muamele edilmiş jel, U.V. ışık altında fotograflandı. PCR programı aşağıda sunulduğu gibi uygulandı. Tablo 4.3'de BAFF promotor genomik PCR reaksiyon bileşenleri gösterilmektedir.

95 °C	60 sn.	}	1	döngü
95 °C	30 sn.		34	döngü
55 °C	35 sn.			
72 °C	30 sn.			
95 °C	10 min.		1	döngü

Tablo 4.3. BAFF Promotor Genomik PCR Reaksiyon Bileşenleri

PCR Komponentleri	1 Reaksiyon	50 µl toplam Hacim
10 X Reaction Buffer	5	µl
25mM MgCl ₂ Solution	3	µl
DMSO	2,5	µl
0,5 mM dNTP	25	µl
Forward Primer(BAFF prmt for)	1	µl
Reverse Primer (BAFF prmt rev)	1	µl
Template genomik DNA(200 ng)	5	µl
InviTaq Taq polimeraz (InviTaq)	0,6	µl
Deiyonize H ₂ O	6,9	µl
Toplam Hacim	50	µl

4.1.10. BAFF RT-PCR Reaksiyonu

BAFF proteininin CDS dizilerini analiz etmek üzere BAFF mRNA'sı üzerinden RT reaksiyonu ile elde edilen BAFF cDNA; BAFF 26 for ve BAFF 1026 rev primerlerinin yardımı ile PCR ortamında çoğaltılmıştır. PCR programı aşağıda sunulduğu gibi uygulandı. Tablo 4.4'de BAFF RT-PCR reaksiyon bileşenleri gösterilmektedir.

95 °C	60 sn.	1	döngü
95 °C	30 sn.	34	döngü
55 °C	35 sn.		
72 °C	30 sn.		
95 °C	10 min.	1	döngü

Tablo 4.4. BAFF RT-PCR reaksiyon bileşenleri

PCR Komponentleri	1 Reaksiyon	50 µl toplam Hacim
10 X Reaction Buffer	5	µl
25mM MgCl ₂ Solution	3	µl
0,5 mM dNTP	25	µl
Forward Primer	1	µl
Reverse Primer	1	µl
Template DNA	5	µl
InviTaq Taq polimeraz	0,5	µl
Bidest	9,5	µl
Toplam Hacim	50	µl

4.1.11. PCR Ürünlerinden DNA Saflaştırılması

Gerek BAFF promotor, gerekse BAFF CDS DNA dizilerinin analizlerinin yapılması için, PCR reaksiyonlarında çoğaltılan DNA fragmentlerinin reaksiyon solüsyonlarından ayrılarak saflaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda DNA fragmentleri saflaştırıldı.

4.1.12. DNA Dizin Analizi

Klinik özelliklerine göre seçilmiş hastaların BAFF promotor ve BAFF CDS DNA fragmenti 4 renk floresan tabanlı otomatik DNA sequencer (ABI-PRISM 377 Gene Analyzer, Perkin-Elmer, Überlengen, Germany) ile üretici firmanın önerdiği protokole göre, DNA dizi analizine tabi tutuldu. Yaklaşık 1 kb büyüklüğündeki DNA fragmentlerinin tam dizi analizini yapabilmek için; dizi analiz reaksiyonu bir kez sense, bir kez de antisense primer ile iki farklı yönde uygulandı. “High Pure PCR Product Purification Kit” ile saflaştırılan PCR ürünleri spektrofotometrik saflık dereceleri ölçülerek kontrol edildi. Reaksiyon komponentleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- | | |
|---|------|
| • Pre-Mix (BigDye; PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) | 2 µl |
| • Gen Spesifik Primer (sense ya da antisense) (20mM) | 1 µl |
| • PCR product | 1 µl |
| • Nuclease-free | 6 µl |

Dizin amplifikasyonu, 25 döngü üzerinden aşağıdaki thermocycler programıyla gerçekleştirildi.

96 °C	3	min.		1	döngü
96 °C	35	sn.	}		
55 °C	10	sn.		30	döngü
60 °C	2	min.			
95 °C	10	min.		1	döngü

Floresan reaksiyon karışımı, Cenri-Sep columnlar aracılığı ile reaksiyon bileşenlerinden ayrıştırılarak, 5 µl reaksiyon ürünü 20 µl TSR solüsyonu ile karıştırıldı ve capillar elektroforez cihazında analiz edildi. Cihaza ait bilgisayardan elde edilen kromotogram ve DNA dizi verisini içeren ab1 ve seq dosyaları veri analizi için kayıt edildi.

Elde edilen DNA dizin verilerini içeren dosyalar ChromasPro (Technelysium Pty Ltd., Australia) ve Lasergene 6 (DNASTAR Inc., USA) programları ile analiz edildi. Bu bağlamda, elde edilen dizinler NCBI Blast programı ve DNA assembly yöntemi ile analiz edildi.

4.1.13. Serum BAFF Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Tespit Edilmesi

Hasta ve kontrol gruplarının serum BAFF düzeyleri, R&D Systems Quantikine® Human BAFF/BLyS Elisa Kit kullanılarak tespit edildi. ELISA kitine ait solüsyonlar, üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlandı ve analiz için kullanılır duruma getirildi. Bazı örneklerin 8000 pg/ml BAFF düzeyinden daha yüksek olabileceği ve standart eğrisinin dışına çıkabileceği düşünülerek, her örnek ½ oranında dilüsyon faktörü ile test edildi.

R&D Systems Quantikine® Human BAFF/BLyS ELISA Kiti Reagentleri ve içerikleri aşağıdaki gibidir.

- **BAFF/BLyS Mikroplate:** (12 X 8) 96 kuyucuklu BAFF monoklonal antikor (Mouse) ile kaplanmış polistyrene mikroplate

- **BAFF/BLyS Konjugat** : Peroksidaz ve koruyucularla konjuge edilmiş 21 mL BAFF poliklonal antikor
- **BAFF/BLyS Standart** : Koruyucularla tamponlanmış ve sonra lyofilize edilmiş 40 ng insan rekombinant BAFF
- **Assay Diluent RD1–72** : Koruyuculardan oluşan bir Buffer
- **Kalibratör Diluent RD6Q:** 21 mL hayvan serumu
- **Wash Buffer** : Koruyucularla tamponlanmış surfaktan
- **Color Reagent A** : 12,5 mL stabilize hidrojen peroksid
- **Color Reagent B** : 12,5 mL stabilize chromogen
- **Stop Solüsyon** : 6 mL 2N Sülfürik asit

ELISA Analizi uygulaması:

1. Mikroplatenin test yapılmak istenen her kuyucuğuna 100 µl Assay Diluent RD1–72 otomatik pipet aracılığı ile aktarıldı.
2. Standart kontrol ve analiz edilecek serum, 50 µl mikropate kuyucuklarına pipetle aktarıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Çok kanallı otomatik pipet yardımı ile Mikropate aspire edildi ve her kuyucuk 400 µl Wash Buffer ile 4 kez yıkandı.
4. 200 µl Konjugat ilave edilerek, 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 3. aşama bir kez daha tekrar edildi.

6. Color Reagent A ve Color Reagent B'nin aynı hacimde karıştırılması ile oluşturulan Substrat solüsyondan 200 µl her kuyucuğa pipetle aktararak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyon eklenerek, 30 dakika içerisinde BioRad Model 680 Elisa Reader ile 450 nm de absorbans değerleri okundu.

Standartlardan okunan absorbans değerlerinin yardımı ile MicroPlate Manager 5,0 (BioRad) programında 5PL (Cook) Logaritmik regression yöntemine göre, hasta ve kontrol grubuna ait serum BAFF düzeyleri hesaplandı.

4.1.14. Klinik Değerlendirme ve Retrospektif Araştırma

Hasta grubunun teşhis ve tedavileri Prof. Dr. A. Salama tarafından düzenlenip; klinik değerlendirmeler ve hastaların ilaç tedavileri, Charite Tıp Üniversitesi Transfüsiyon Medisinin Enstitüsü arşivindeki hasta kayıtlarından temin edildi. Ayrıca; klinik değerlendirme önemli olan anti-Trombosit antikor testleri, aynı Enstitünün Trombosit Laboratuvarındaki imkanlar kullanılarak yapıldı.

4.1.15. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamındaki tüm istatistiksel analizler, Microsoft Excel ve bu programın Add In istatistik yazılımı olan “Analyse-it” aracılığı ile yapıldı.

4.2. Araçlar ve Materyal

4.2.1. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma Adı
Geno M™–6 Geno Vision™ DNA izolatörü	(A QIAGEN Company)
Smartspec Plus spektrofotometer	(BioRad)
iCycler Thermal Cycler	(BioRad)
Mikroplate Reader, Model 680	(BioRad)
ABI-PRISM 310 Gene Analyzer	(Perkin-Elmer)
5414C santrifüj	(Brinkman Eppendorf)
Minifuge RF termostatlı santrifüj	(Hereaus)

4.2.2. Materyal

Materyal	Firma Adı
High Pure RNA Isolation Kit	(Roche Applied Science)
Red Blood Cell Lysis Buffer	(Roche Applied Science)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	(Fermentas)
Ribonuclease Inhibitor (20 u/μl)	(Roche Applied Science)
dNTP Mix, 10mM	(Fermentas)
RevertAid™ H Minus M-MuLV	(Fermentas)
DMSO	(Invitrogen)
25mM MgCl ₂ Solution	(Fermentas)
10 x NH ₄ -Reaction Buffer InviTaq Taq polymerase	(İnvitek)
BigDye; Pre-Mix	(PE Applied Biosystems)
Nuclease-free H ₂ O	(Fermentas)
Centri-Sep column	(PE Applied Biosystems)
High Pure PCR Product Purification Kit	(Roche Applied Science)
Quantikine® Human BAFF/BLyS ELISA Kiti	(R&D Systems)

4. BULGULAR

5.1. RNA İzolasyonu İle Elde Edilen Bulgular

RNA izolasyonu ile elde edilen bazı RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri Tablo 5.1'de sunulmaktadır. İzole edilen RNA düzeyinin semi-quantitatif RT-PCR analizi yapılması açısından yeterli olmadığı ancak, PCR için yeterli olduğu Tablo 5.1'den anlaşıldığından, quantitatif RT-PCR uygulamaları için başka bir izolasyon kiti ya da metodunun kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Tablo 5.1. İzole Edilen Bazı RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü

RNA_ID.	OD1	OD2	OD3	Ortalama OD	Konsantrasyon (ng/μl).
5	0,24	0,237	0,24	0,2390	9,56
6	0,178	0,17	0,163	0,1703	6,81
7	0,207	0,203	0,21	0,2067	8,27
8	0,128	0,098	0,096	0,1073	4,29
9	0,111	0,123	0,108	0,1140	4,56
10	0,168	0,191	0,186	0,1817	7,27
11	0,277	0,278	0,276	0,2770	11,08
12	0,148	0,172	0,187	0,1690	6,76
13	0,204	0,18	0,222	0,2020	8,08
14	0,155	0,175	0,148	0,1593	6,37
15	0,239	0,244	0,263	0,2487	9,95
16	0,13	0,137	0,131	0,1327	5,31
17	0,542	0,527	0,522	0,5303	21,21
18	0,369	0,332	0,368	0,3563	14,25
19	0,136	0,11	0,117	0,1210	4,84
20	0,25	0,267	0,279	0,2653	10,61
21	0,238	0,213	0,238	0,2297	9,19
22	0,27	0,289	0,292	0,2837	11,35
23	0,229	0,217	0,221	0,2223	8,89
24	0,813	0,827	0,827	0,8223	32,89
25	0,582	0,621	0,617	0,6067	24,27
26	0,275	0,26	0,299	0,2780	11,12
27	0,439	0,424	0,427	0,4300	17,20
28	0,585	0,574	0,584	0,5810	23,24
29	1,092	1,112	1,116	1,1067	44,27
30	0,229	0,277	0,271	0,2590	10,36
31	0,139	0,151	0,147	0,1457	5,83
32	0,319	0,353	0,317	0,3297	13,19
33	0,216	0,225	0,233	0,2247	8,99
34	0,478	0,496	0,496	0,4900	19,60
35	0,199	0,197	0,193	0,1963	7,85

5.2. DNA İzolasyonu İle Elde Edilen Bulgular

İzole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümü sonucunda Tablo 5.2'de sunulan bulgulara ulaşıldı. Bu sonuçlar ışığında PCR reaksiyonlarında kullanılacak template DNA miktarları hesaplandı.

Tablo 5.2. Bazı Hastaların İzole Edilmiş DNA'larının Konsantrasyonları

DNA ID	Konsantrasyon [ng/μl]	Konsantrasyon [ng/μl]	Konsantrasyon [ng/μl]	Ortalama [ng/μl]
1	58,923	59,895	59,814	59,54
2	37,749	38,631	37,163	37,85
3	55,552	60,954	56,51	57,67
4	52,547	48,887	48,193	49,88
5	70,125	69,275	67,585	69
6	71,749	61,362	58,196	63,77
7	62,018	62,51	63,004	62,51
8	77,839	74,859	74,164	75,62
9	40,555	40,778	42,871	41,4
10	62,018	61,362	60,22	61,2
11	70,892	64,244	63,087	66,07
12	62,264	63,004	59,165	61,48
13	44,529	45,592	41,299	43,81
14	30,038	28,626	30,392	29,69
15	48,81	49,119	48,733	48,89
16	44,984	43,397	42,345	43,58
17	52,861	50,359	47,425	50,22
18	88,046	87,215	86,112	87,12
19	40,109	41,224	40,703	40,68
20	86,602	83,593	84,501	84,90
21	63,045	64,616	64,119	63,93
22	53,856	54,722	52,906	53,83
23	47,471	47,41	74,855	38,67
24	45,487	44,426	43,897	37,83

5.3. Gradient PCR Bulguları

Gradient PCR reaksiyonu BAFF prmt for ve rev primerleri için gerçekleştirildi. Bunun sonuca göre; 200 ng genomik template DNA için en uygun annealing temperaturü 55°C olarak belirlendi (Şekil 5.1). BAFF 26 for ve 1026 rev primerleri

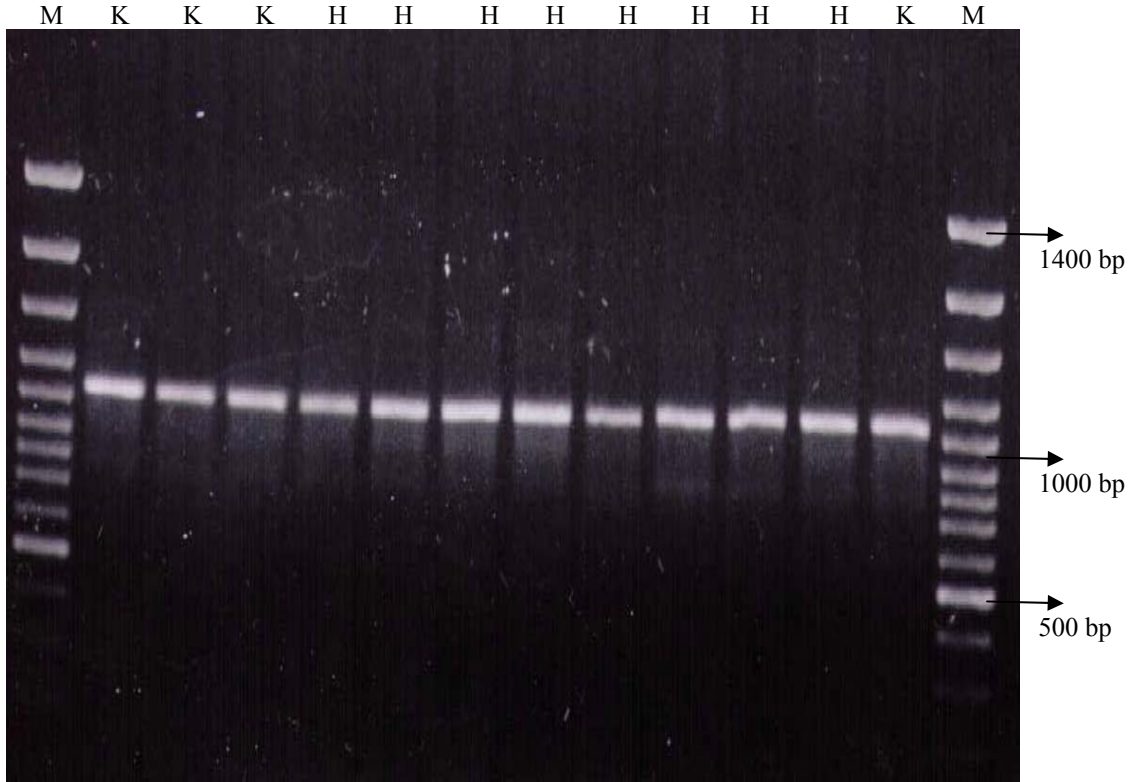
için de aynı gradient PCR protokolü uygulandı ve 55°C annealing temperaturü optimal olarak bulundu.



Şekil 5.1. BAFF prmt for ve rev primerleri için yapılan Gradient PCR Sonuçlarının %0.8 Jel Elektroforez Profili (1,4 kb Fermentas GenRuler DNA Ladder marker DNA kullanılmıştır).

5.4. BAFF Promotor ve cDNA PCR ile elde Edilen Bulgular

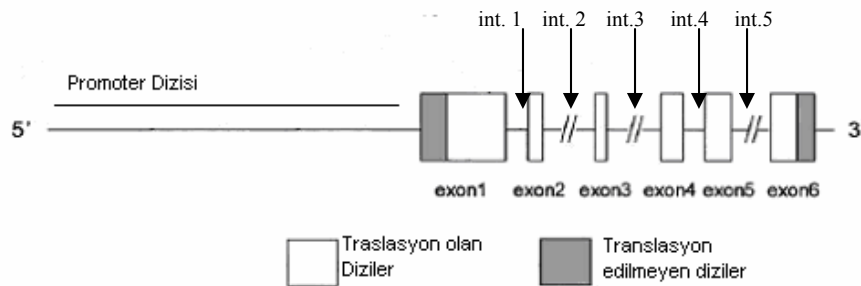
PCR reaksiyonu sonucunda BAFF promotor ve cDNA fragmentleri, beklenen büyüklükte %0.8 agaroz jel üzerinde gözlemlendi. Bu bulgular ışığında, gerek BAFF promotor DNA dizisi gerekse mRNA'ya çevrilen DNA dizisi üzerinde PCR metodu ile gözlemlenebilecek bir genetik değişiklik olmadığı sonucuna varıldı. Şekil 5.2'de hasta ve kontrol grubundan bireylerin BAFF promotor PCR reaksiyon sonuçları %0.8 agaroz jel üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 5.2. 1072 bp Uzunluğundaki BAFF Promotor Dizisinin PCR reaksiyon Sonucunun %0.8 Jel Elektroforez Profili (H=Hasta, K=Kontrol, 1.4 kb Fermentas GenRuler DNA Ladder marker DNA).

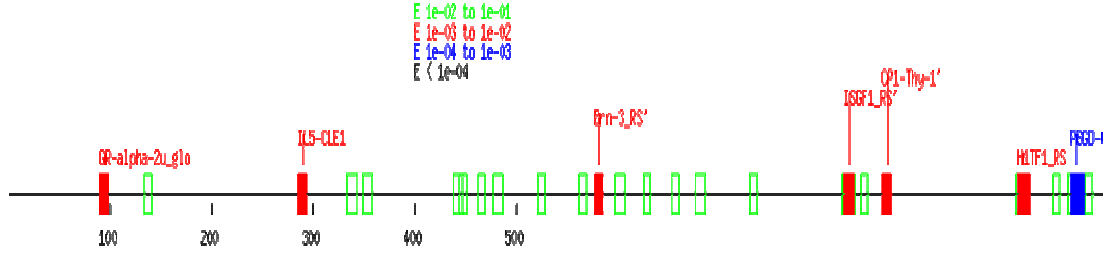
5.5. Biyoinformatik Yöntemlerle Elde Edilen Bulgular

Genbank AF116456 kodlu mRNA dizisinin, NCBI ve UCSC veri bankalarında, BLAST ve BLAT programları yardımıyla, insan genomu ile karşılaştırılması sonucunda, BAFF geninin intron-exon yapısı tespit edildi. Bu bağlamda, BAFF geninin 6 exon ve 5 introndan oluştuğu tespit edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. BAFF Geninin Organizasyonu.

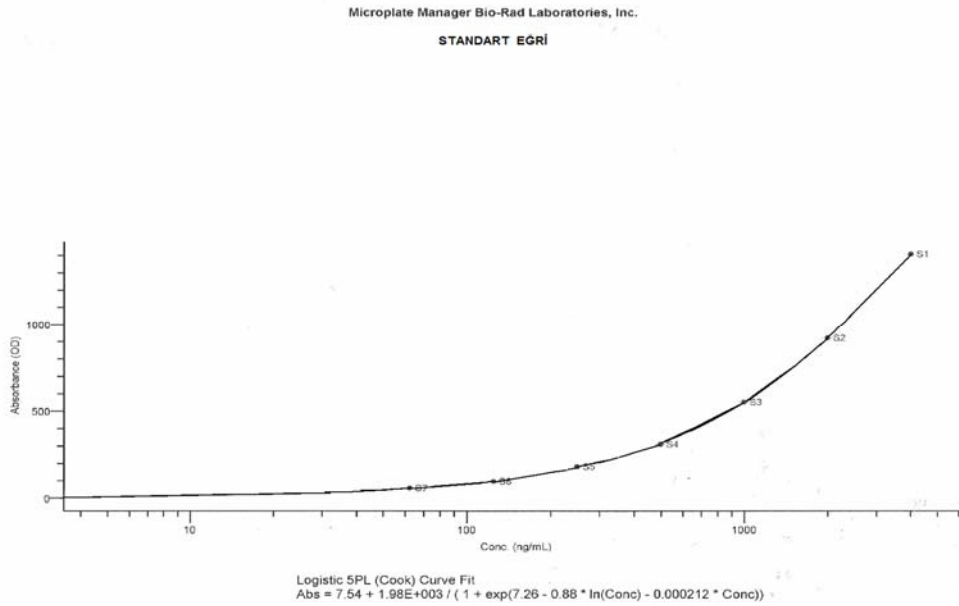
BAFF promotor PCR reaksiyonunda kullanılan, BAFF prmt for ve rev primerlerinin sınırladığı 1072 nükleotidlik DNA dizisi, Transkripsiyon Faktör bağlantı dizileri açısından analiz edilerek, Şekil 5.4'deki sonuçlar elde edildi.



Şekil 5.4. 1072 bp Promotor Dizisi Üzerindeki Olası TF Bağlantı Dizileri.

5.6. ELISA Metodunda Elde Edilen Bulgular

ELISA metodu uygulanmasında, standartlardan elde edilen absorbans değerlerinden Şekil 5.5'deki gösterilen fonksiyon elde edildi. Bu fonksiyon, kitin kullanım kılavuzunda verilen fonksiyon ile uyum içindedir. Bu bağlamda, ELISA metodunun doğru bir şekilde uygulandığı sonucuna varıldı. Test edilen BAFF serum seviyeleri bu fonksiyon kullanılarak hesaplandı.



Şekil 5.5. BAFF ELISA Standart Eğrisi.

5.7. Kontrol Grubuna Ait Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları

9 sağlıklı kadın ve 15 sağlıklı erkekten oluşan; 39,4 yaş ortalamasına sahip kontrol grubunun, serum BAFF protein seviyesi ELISA metodu ile ölçüldü. Kan sayımı bilgileri ve anti-trombosit otoantikor araştırma testi (MAIPA) sonuçları Tablo 5.3’de sunulmaktadır.

24 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu ortalama 6,82 K/ μ L (6,85 K/ μ L medyan) lökosit sayısı, 290 K/ μ L trombosit sayısı, 13,8 g/dL (14,1 g/dL medyan) hemoglobin değeri ve 952 pg/ml (941 pg/ml medyan) serum BAFF seviyesi istatistiksel değerlerini yansıtmaktadır.

Tablo 5.3. Kontrol Grubunun Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları (WBC: Toplam Lökosit Sayısı, Hb: Hemoglobin, PLT: Trombosit Sayısı, K/E: Kadın/Erkek)

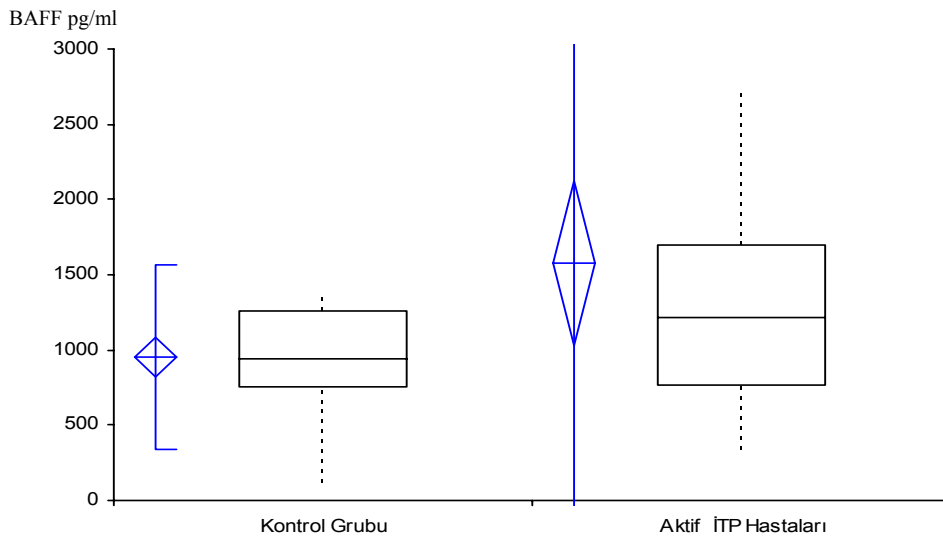
Kontrol No	K/E	Yaş	BAFF (pg/ml)	WBC (K/ μ L)	Hb (g/dL)	PLT ($\times 10^3$)	Otoantikor
1	K	42	946	5,60	12,5	294	-
2	E	34	1042	10,00	14,0	282	-
3	E	36	1081	5,30	14,7	310	-
4	E	37	1254	5,30	16,0	310	-
5	E	59	1382	7,70	15,0	250	-
6	K	53	1263	8,00	13,6	338	-
7	E	26	742	8,30	14,0	272	-
8	E	31	900	6,30	15,2	270	-
9	E	42	1257	8,00	14,4	377	-
10	E	51	890	5,30	14,6	233	-
11	E	40	1186	7,00	14,7	190	-
12	K	43	1315	9,00	14,3	311	-
13	E	30	116	10,70	16,0	286	-
14	K	40	1008	7,00	16,0	350	-
15	K	52	470	5,20	14,8	305	-
16	E	45	760	5,50	13,0	252	-
17	E	44	714	7,60	12,5	287	-
18	E	40	569	4,30	12,3	330	-
19	K	27	782	5,03	12,7	317	-
20	K	24	752	5,10	11,2	220	-
21	E	35	937	6,21	13,2	250	-
22	E	42	907	7,20	15,1	333	-
23	K	50	1319	7,40	11,2	334	-
24	K	24	1278	6,70	12,0	280	-

5.8. Aktif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları

90 farklı hastadan, hastalığın remisyon ve/veya hastalığın aktif olduğu zamanlarda alınan 175 örnek üzerinden, trombosit sayısı 90 K/ μ L kıstası altında olan 32 örnek seçilerek, hastalığın aktif döneminde serum BAFF seviyesi ve kan sayım bulguları kayıt edildi. Bulgular Tablo 5.4’de sunulmaktadır. Tabloda ayrıca, Prednisolon ile immün baskılayıcı tedavi altında bulunan hastaların aldıkları ilaç miktarı da gösterilmektedir.

5.8.1. Aktif İTP Hastalarının Sağlıklı Kontroller ile Serum BAFF Düzeyi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 5.4’de gösterilen hastalığın aktif döneminde bulunan İTP hastalarında, 1596 pg/ml ortalama serum BAFF (1221 pg/ml medyan), 43,94 K/ μ L ortalama trombosit (40,50 K/ μ L medyan), 8,69 g/dL ortalama hemoglobin (8,65 g/dL medyan) ve 6,97 K/ μ L ortalama lökosit (7,35 K/ μ L medyan) değerleri elde edildi. Serum BAFF değeri için, iki grup için yapılan Mann-Whitney U testi sonucunda U değeri 523,0 hesaplanarak, $p < 0,05$ oranı ile iki grup arasında marjinal bir farkın olduğu tespit edildi (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Kontrol Grubu ile Aktif İTP Hastalarının Serum BAFF Seviyesinin Karşılaştırılması.

Tablo 5.4. Aktif İTP Hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları
(WBC: Toplam Lökosit Sayısı, Hb: Hemogloblin, PLT: Trombosit Sayısı, İTP-TR; Tedaviye cevap vermeyen hastalık tipi, K/E: Kadın/Erkek)

Hasta No.	K/E	Hastalık	BAFF (pg/ml)	PLT (K/ μ L)	Hb (g/dL)	WBC (K/ μ L)	Prednisolon (g/d)
1	E	İTP	767	86	6,20	4,10	
2	E	İTP	916	84	8,80	5,00	
3	E	İTP	6677	38	7,70	4,17	5,00
4	K	İTP	576	58	9,10	4,91	7,5
5	K	İTP	817	41	8,00	3,30	
6	K	İTP	1331	55	7,90	4,17	5
7	K	İTP	1721	31	9,80	8,78	
8	K	İTP	1820	76	8,00	5,48	
9	K	İTP	6909	78	8,40	8,44	
10	K	İTP	2209	19	9,10	7,69	
11	E	İTP	605	59	10,00	4,68	10
12	K	İTP	746	33	8,50	8,00	
13	E	İTP	1402	89	8,94	5	
14	K	İTP	1229	35	9,59	6,35	
15	K	İTP	1307	43	11,50	8,7	
16	E	İTP	1690	40	8,50	6,17	7,5
17	E	İTP	1699	55	9,10	10,16	5
18	E	İTP	2746	49	7,80	3,76	
19	E	İTP	1113	13	6,00	7,24	
20	K	İTP	1172	67	8,70	5,54	
21	K	İTP	1117	75	8,40	6,15	12,5
22	K	İTP	1427	48	7,20	9,90	
23	K	İTP-TR	773	26	8,60	7,35	4
24	E	İTP-TR	1423	30	10,40	12,18	20
25	E	İTP-TR	803	17,5	7,91	11,6	
26	E	İTP-TR	957	3	7,90	8,06	
27	K	İTP-TR	1213	52	7,60	6,98	
28	K	İTP-TR	3153	14	11,20	8,7	
29	K	İTP-TR	484	4	8,90	9,11	5
30	E	İTP-TR	1073	23	9,0	7,34	
31	K	İTP-TR	1470	6	6,40	7,44	7,5
32	E	İTP-TR	680	10	9,50	8,75	5

5.9. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları

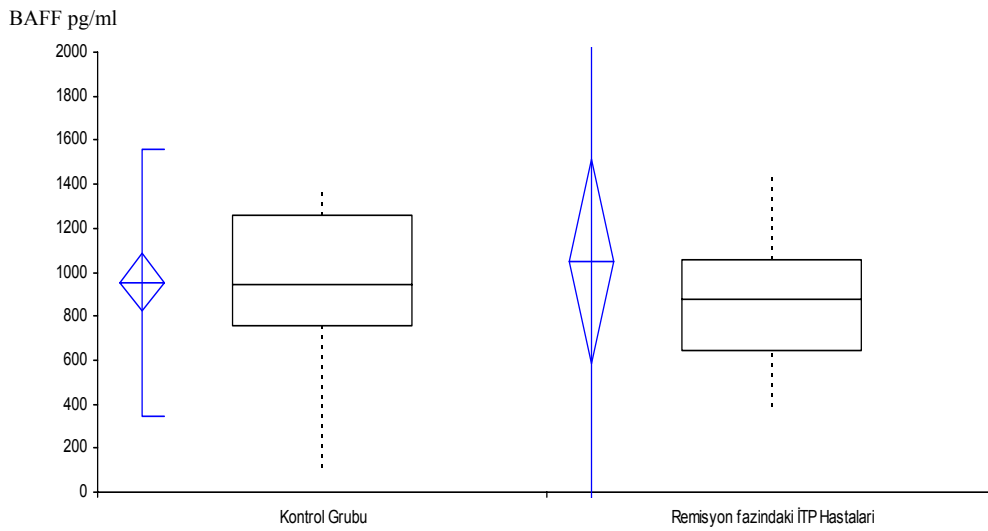
90 hasta ve 175 örnek üzerinden; hastalığın remisyon fazında bulunan 26 hastanın serum BAFF seviyesi ve kan sayımı bulguları Tablo 5.5’de sunulmaktadır. Tabloda İTP-TR olarak nitelendirilen hastalar immün supresif tedaviye cevap vermeyen hastalardır.

Tablo 5.5. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları (WBC: Toplam Lökosit Sayısı, Hb: Hemogloblin, PLT: Trombosit Sayısı, İTP-TR; Tedaviye cevap vermeyen hastalık tipi, K/E: Kadın/Erkek)

Hasta No.	Cinsiyet	Hastalık	BAFF (pg/ml)	PLT (K/ μ L)	Hb (g/dL)	WBC (K/ μ L)	Prednisolon (g/d)
1	K	İTP	635	160	8,40	6,81	-
2	E	İTP	1144	170	8,13	3,36	-
3	E	İTP	407	164	7,33	6,57	10
4	K	İTP	386	104	7,80	10,93	20
5	K	İTP	1022	260	8,60	11,04	-
6	K	İTP-TR	753	121	7,60	12,6	-
7	K	İTP	3614	262	8,80	9,74	-
8	K	İTP	1370	152	10,00	8,12	-
9	K	İTP-TR	1453	164	7,75	5,03	-
10	K	İTP	545	147	8,60	5,05	-
11	E	İTP	875	103	9,50	9,50	10
12	E	İTP	875	100	9,50	9,50	
13	K	İTP	976	102	7,00	10,58	10
14	E	İTP	667	247	9,70	13,40	20

5.9.1. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF Seviyesinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

Tablo 5.5’de verilen remisyon fazındaki hasta örneklerinden 1047 pg/ml ortalama serum BAFF (843 pg/ml medyan), 180 K/ μ L ortalama trombosit (159 K/ μ L medyan), 8,26 g/dL ortalama hemoglobin (8,13 g/dL medyan) ve 7,9 K/ μ L ortalama lökosit (8,0 K/ μ L medyan) değerleri elde edildi. Mann-Whitney U testinin, sağlıklı kontrol ve remisyon grubu serum BAFF değerleri arasında uygulanması ile $P > 0.05$ değeri elde edildi. Bu bağlamda, iki grup arasında istatistiksel anlamlılık tespit edilemedi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Remisyon Fazındaki İTP Hastalarının Serum BAFF Düzeyinin Sağlıklı Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması.

5.10. Prednisolon İle İmmünpresif Tedavi Altında Bulunan İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları

Toplanan örnekler içerisinde, bağışıklık sistemi Prednisolon ile baskılanmakta olan İTP hastalarının serum BAFF seviyeleri ve kan sayımı bilgileri Tablo 5.6’da sıralanmaktadır. Bazı hastalarda; Azathioprin, Dexametason, Metotrexat ikincil ajanlarıyla kombine tedavi protokolü uygulandığından bu hastalar ayrıca gösterildi.

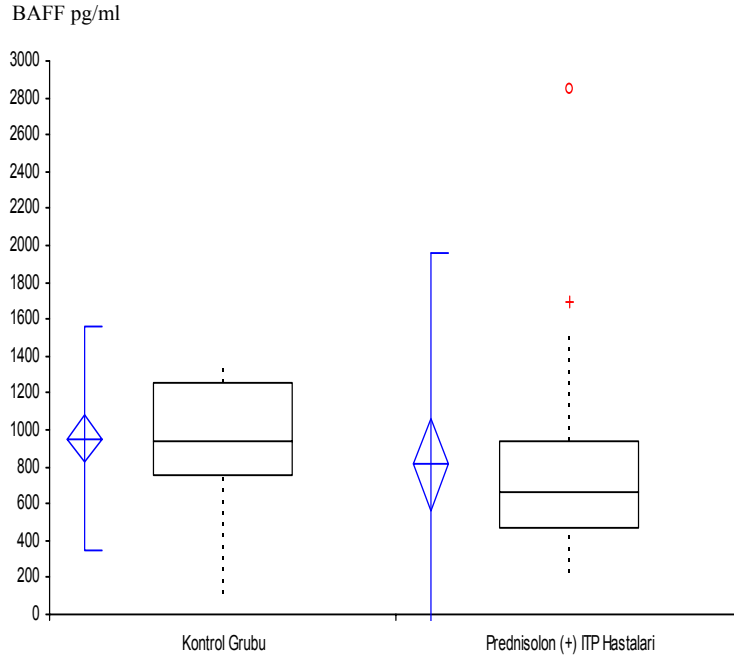
Tablo 5.6. Prednisolon ile Tedavi Edilen Hastaların Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları

Hasta No.	K/E	BAFF (pg/ml)	PLT(K/ μ L)	Prednisolon (g/d)	Kombine Tedavi
1	E	407	164	10,0	+
2	K	538	73	5,0	
3	K	386	104	20,0	+
4	K	1699	19	5,0	+
5	E	493	59	30,0	
6	K	773	43	4,0	
7	E	240	88	80,0	
8	E	484	13	5,0	
9	E	875	103	10,0	+
10	K	680	75	5,0	
11	K	820	48	10,0	
12	E	667	247	20,0	+
13	K	222	3	30,0	
14	K	1450	143	7,5	
15	K	1555	166	7,5	
16	K	585	121	30,0	+
17	K	335	186	20,0	
18	K	2846	186	2,5	
19	E	576	30	7,5	
20	E	336	18	50,0	+
21	K	961	5	2,5	+
22	E	1095	23	7,5	+
23	E	653	27	10,0	
24	K	813	92	10,0	

5.10.1 Prednisolon ile İmmünespresif Tedavi Altında Bulunan İTP Hastalarının Serum BAFF Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

Tablo 5.6’da sunulduğu gibi, 812 pg/ml ortalama serum BAFF (660 pg/ml medyan) ve 85 K/ μ L ortalama trombosit (74 K/ μ L medyan) değerleri elde edildi. Prednisolon ile immün supresif tedavi altında olan hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında Mann-Whitney U testinin sonucunda, iki grubun arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir fark tespit edildi ($P<0,05$). İki grubun karşılaştırılması Şekil 5.8’de sunulmaktadır.



Şekil 5.8. Prednisolon ile Tedavi Altında Bulunan İTP Hastaları ile Sağlıklı Kontrol Grubunun Karşılaştırılması.

5.11. Otoantikor Pozitif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesi ve Kan Sayımı Bulguları

MAIPA testi sonucunda, trombosit antijenlerine karşı; gerek trombosit yüzeyine bağlanmış, gerekse serumda otoantikorlara sahip olan ya da ikincil bir hastalık nedeniyle otoantikor üretiminin var olduğu tespit edilmiş, 19 hastaya ait bulgular Tablo 5.7’de sunulmaktadır.

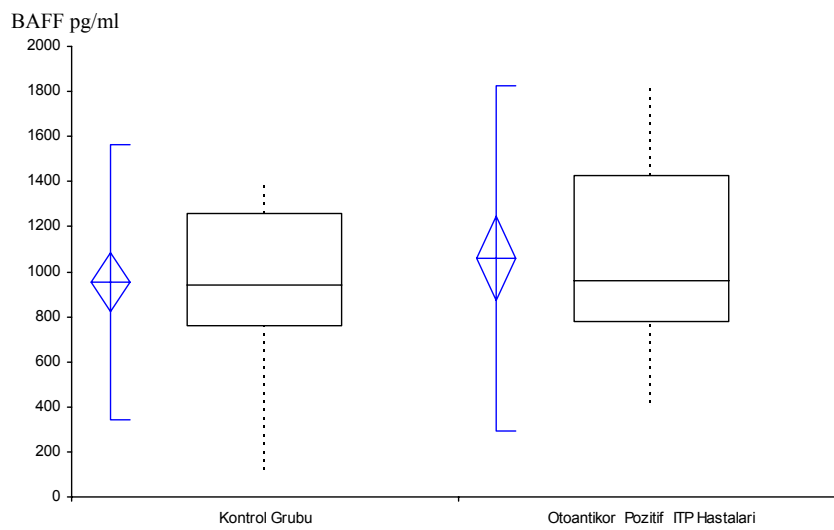
5.11.1 Otoantikor Pozitif İTP Hastalarında Serum BAFF Seviyesinin Sağlıklı Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

Tablo 5.7’de sunulan bulgulardan; 1058 pg/ml ortalama serum BAFF (957 pg/ml medyan) ve 64 K/ μ L ortalama trombosit (60 K/ μ L medyan) değerleri elde edildi. Serum BAFF değerlerinin, Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması

sonucunda elde edilen $p>0.05$ değeri nedeniyle, iki grubun birbiri ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi. Her iki grup, Şekil 5.9’de serum BAFF seviyesine göre karşılaştırılmaktadır.

Tablo 5.7. Otoantikor üretiminin tespit edildiği İTP hastalarının Serum BAFF ve Kan Sayımı Bulguları (K/E: Kadın/Erkek, PLT: Trombosit Sayısı)

Hasta No	K/E	Hastalık	BAFF (pg/ml)	PLT(K/ μ L)
1	K	İTP	1820	41
2	K	İTP	520	28
3	K	İTP	803	60,00
4	K	İTP	1427	35
5	K	İTP	773	43
6	K	İTP	1073	67
7	K	İTP	680	75
8	K	İTP	791	115
9	K	İTP	1555	166
10	K	İTP	891	14
11	K	İTP	1117	26
12	K	İTP	957	61
13	E	İTP	1470	86
14	K	İTP-TR	767	26
15	E	İTP-TR	419	11
16	K	İTP-TR	1453	164
17	E	İTP-TR	1431	10
18	K	İTP	1340	90
19	K	İTP	813	92



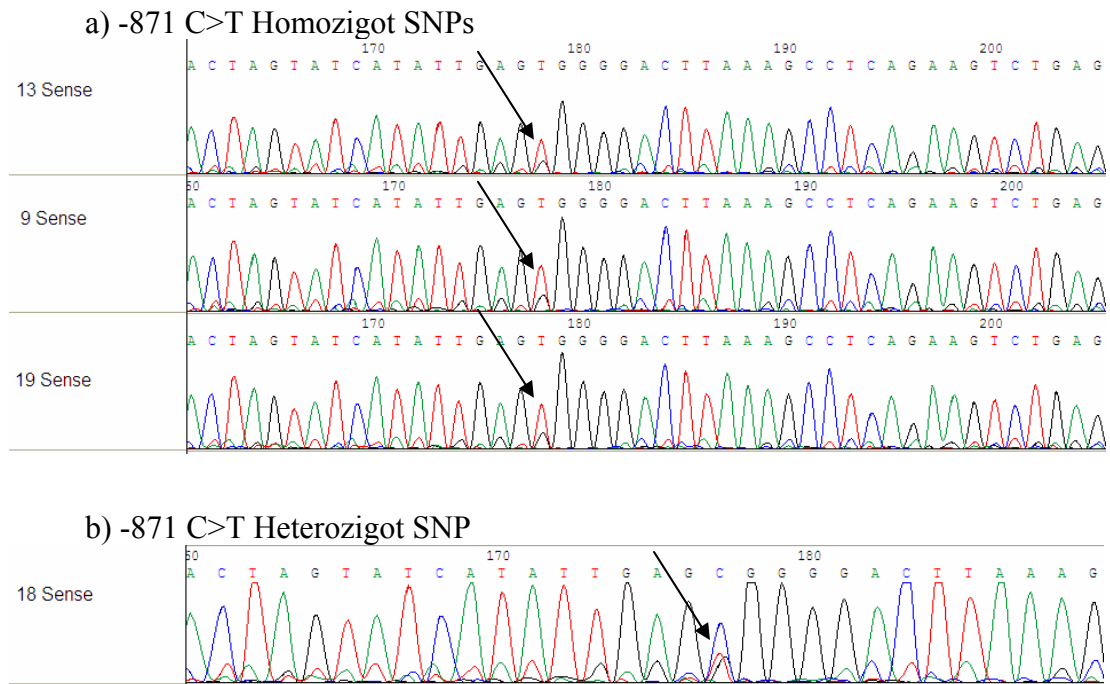
Şekil 5.9. Otoantikor Pozitif İTP Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Grubunun Karşılaştırılması.

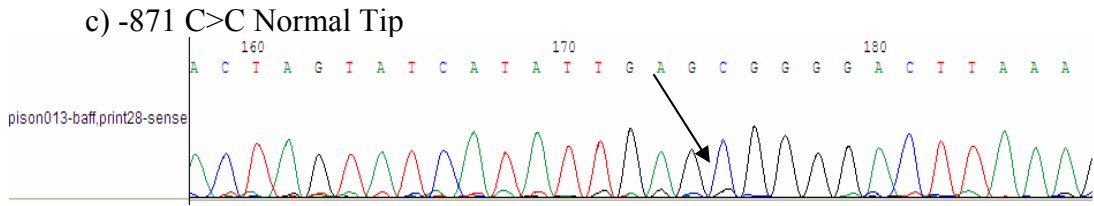
5.12. BAFF cDNA ve Promotor DNA Dizinlerinin Analizi

BAFF geninin protein kodlayan DNA dizisi ve promotor DNA dizisinde meydana gelebilecek bir mutasyon ile hastalık arasında bir ilişki olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, söz konusu DNA dizileri, DNA dizi analizi ile incelendi ve aşağıdaki bulgulara ulaşıldı.

5.12.1 BAFF Promotor DNA Dizin Analiz Bulguları

19 hasta ve 10 kontrol grubu üyesinden yapılan BAFF promotor DNA dizi analizi sonucunda; hasta ve kontrol grubunda pozisyon -871 C>T, -661 A>G, -771 G>A, -542 G>A ve -353 G>C tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tespit edildi. Polimorfizmlerin belirlendiği bazı kromotogram görüntüleri Şekil 5.10'da sunulmaktadır. Dunnen and Antonarakis (2000) baz alınarak, SNP'lerin pozisyonları genomik DNA referansı olarak verildi. Tablo 5.8'de tek nükleotid polimorfizmleri gösteren hastalarının ve kontrol grubunun dökümü verilmektedir.





Şekil 5.10. BAFF Promotor DNA Dizi Analizinde Gözlemlenen -871 SNP'sinin kromotogram görüntüleri. Oklar, değişimlerin gözlemlendiği nükleotidleri göstermektedir.

Tablo 5.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında BAFF Promotor SNP'leri

DNA No.	HASTALIK	Pozisyon -871 C >T	Pozisyon -661 A>G	Pozisyon -771 G>A	Pozisyon -353 G>C	Pozisyon -542 A>G	BAFF (pg/ml)
1	İTP	-	-	-	-	-	1140
2	İTP	Heterozigot	Heterozigot	Heterozigot	-	-	2000
3	İTP	Homozigot	-	-	-	-	4404
4	İTP	Homozigot	-	-	-	-	2846
5	İTP	Heterozigot	-	Heterozigot	Heterozigot	-	1567
6	İTP	Homozigot	-	-	-	-	1172
7	İTP	-	-	-	-	-	1117
8	İTP	-	-	-	-	-	746
9	İTP	-	-	-	-	-	1453
10	İTP	-	-	-	-	-	1988
11	İTP	-	-	-	-	-	1238
12	İTP-TR	Homozigot	-	Heterozigot	-	Heterozigot	1453
13	İTP-TR	Heterozigot	Heterozigot	Heterozigot	-	Heterozigot	336
14	İTP-TR	Heterozigot	-	-	-	-	1431
15	İTP-TR	Heterozigot	-	-	-	-	1690
16	İTP-TR	Homozigot	-	-	-	-	1721
17	İTP-TR	Heterozigot	-	-	-	-	753
18	İTP-TR	-	-	-	-	-	2209
19	İTP-TR	Heterozigot	-	-	-	-	576
20	Kontrol	-	-	-	-	-	1278
21	Kontrol	Heterozigot	-	-	-	-	1270
22	Kontrol	Homozigot	-	-	-	-	1576
23	Kontrol	Heterozigot	-	-	-	-	1319
24	Kontrol	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot	1323
25	Kontrol	-	-	-	-	-	1323
26	Kontrol	-	-	-	-	-	1042
27	Kontrol	Heterozigot	-	-	-	-	1529
28	Kontrol	Homozigot	-	-	-	-	470
29	Kontrol	Heterozigot	-	-	-	-	1788

Kontrol grubunun 10 üyesinden 2 tanesi (% 20) homozigot; 5 tanesi heterozigot (%50) olmak üzere, -871 pozisyonunda, toplam 7 tane (%70) C>T polimorfizmi görüldü. Buna karşılık; 19 İTP hastasından 7'si (% 36) heterozigot ve

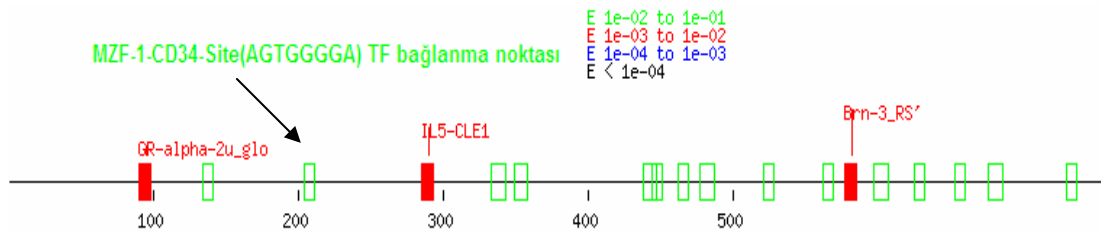
5'i (%20) homozigot olmak üzere, aynı pozisyonda toplam 12 tane (%56) C>T polimorfizmi gözlemlendi.

Ayrıca, -771 pozisyonundaki G>A polimorfizmi hiçbir kontrol grubu üyesinde tespit edilmezken, 19 hastadan 4'ünde (% 21) heterozigot bir genotip ile kendini göstermektedir. -542 pozisyonunda gözlemlenen A>G SNP'si ise; 10 kişilik kontrol grubundan sadece bir tanesinde (%10) heterozigot karakterde gözlemlenmekte iken, 19 kişilik hasta grubundan 2 kişide (% 10,5) heterozigot olarak kendini göstermektedir.

5.12.1.1. BAFF Promotor SNP'lerinin Biyoinformatik Karakteristikleri

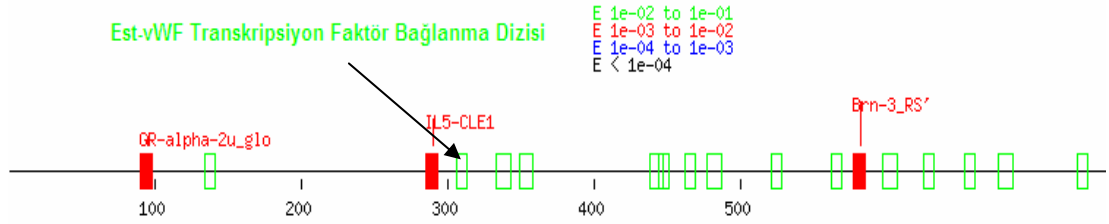
Bu çalışmada; BAFF promotor DNA dizi analizi sonucunda gözlemlenen SNP'lerin Transkripsiyon Faktör bağlanma dizilerini etkileyip etkilemeyeceğinin teorik olarak değerlendirmesi yapıldı.

Bu bağlamda, -871 pozisyonundaki C>T SNP'nin normalde promotor üzerinde bulunmayan, yeni bir transkripsiyon faktör bağlanma noktası oluşturduğu gözlemlendi. -871 pozisyonundaki C>T değişimi, -873/-866 nükleotidleri arasında "AGTGGGGA" dizisinden oluşan MZF-1-CD34-Site (AGTGGGGA) TF bağlanma noktası oluşturmaktadır. Şekil 5.11'de bu değişim şematize edilmektedir.



Şekil 5.11 -871 Pozisyonundaki C>T SNP'sinin Sonucu Oluşan MZF-1-CD34-Site (AGTGGGGA) TF Bağlanma Noktası.

-771 pozisyonundaki G>A değişimi de, tıpkı diğer SNP gibi, normalde promotorda olmayan bir TF bağlanma dizisinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu dizin -771/-765 pozisyonunda bulunan Est-vWF dizinidir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. -771 Pozisyonundaki G>A SNP'sinin Sonucu Oluşan Est-vWF TF Bağlanma Noktası.

BAFF promotor DNA dizininde bulunan diğer SNP'lerden etkilenen veya oluşan bir TF bağlanma dizisi tespit edilemedi.

5.12.2 BAFF cDNA Dizi Analizi Bulguları

10 Hasta ve 10 Kontrol üzerine yapılan DNA dizin analizi sonucunda; gerek hasta ve kontrol grubu arasında, gerekse de veri bank karşılaştırmalarında herhangi bir genetik değişiklik gözlenmedi.

6. TARTIŞMA

6.1. Serum BAFF Seviyesi Bulgularının Karşılaştırılması

Bu çalışmada; aktif İTP hastalarında serum BAFF seviyesi için 1596 pg/ml ortalama değeri, sağlıklı kontrol grubunda ise, 953 pg/ml ortalama değeri tespit edildi. Remisyon safhasındaki hasta grubunda gözlemlenen serum BAFF seviyesi ise, 1047 pg/ml ortalama değeri ile, kontrol grubunun gösterdiği değere yaklaşmaktadır. Bu bulgular; Romatoid Arthritis, Sistemik Sklerosis ve SLE hastalığı üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir (Zhang et al., 2005; Ramanujam et al., 2005; Ittah et al., 2006; Matsushita et al., 2006).

Bu üç grup arasındaki göreceli fark; aktif İTP hastalarında BAFF seviyesinin yükselerek hastalığın patogenezinde rol aldığını, tedavi sonrasında veya spontane remisyon safhasına geçen hastalarda, BAFF ekspresyonunun azalarak hastalık tablosunun ortadan kalkmasına katkıda bulunduğuna dair ipuçları vermektedir. Bu noktada; BAFF sitokinin otoimmün hastalıkların etiyolojisinde ya da patofizyolojisinde rol alıp almadığı sorusunun cevabı, yapılan bu çalışma verileri ışığında, BAFF proteinin gerek T lenfosit aracılıklı gerekse B lenfosit aracılıklı efektör mekanizmalarda görev alarak otoimmün hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı şeklinde verilmektedir. Yukarıda anlatılan yönleriyle bu çalışma; aktif İTP hastalarında BAFF serum düzeyinin arttığını ortaya koyan ilk çalışma olarak, ilgili literatüre katkıda bulunmaktadır.

Trombosit otoantikörlerinin pozitif tespit edildiği hasta grubunun serum BAFF seviyesi, 1057 pg/ml ortalama değerini sergilemektedir. Bu değer; kontrol grubunun ortalama değeri ile istatistiksel bir anlamlılık içerisinde değildir ($P=0,34$). Bu sonuçlar, İTP hastalığında anti-trombosit otoantikörleri ve BAFF serum düzeyi arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Çalışmadan elde edilen bu bulguyu destekleyecek şekilde; gerek SLE, gerekse RA üzerinde yapılan diğer çalışmalarda da serum BAFF düzeyi ile otoantikör arasındaki anlamlı bir ilişki rapor edilmemiştir

(Ramanujam et al., 2005; Zhang et al., 2005; Ittah et al., 2006; Matsushita et al., 2006).

Aynı hastalardan, tekrarlayan zaman aralıklarında alınan örneklerin değerlendirilmesi, serum BAFF düzeyi ile hastalık aktivitesi arasında bir ilişkinin var olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda; BAFF seviyesine göre ters yönde değişen trombosit sayısı tespit edildi. Bu bulgu; BAFF proteinin, İTP hastalığında olası bir aktivite markeri olabileceğini göstermektedir.

Prednisolon tedavisi altında bulunan hasta grubunun serum BAFF seviyesinin; 660 pg/ml ortalama değeri, kontrol grubu ortalama değeri olan 952 pg/ml'nin altında bulunmaktadır. Aynı zamanda; bu grup ya remisyon ya da hafif aktif hastalık fazlarında bulunmaktadır. Bu bulgular; Prednisolon ile immün supresif tedavinin BAFF serum değerini düşürdüğünü göstermektedir. Prednisolon ile tedavi sonucunda; BAFF proteininin serum seviyesinin azaldığının gösterilmesi, bu proteine ait gen üzerinde ekspresyonu negatif düzenleyen “Glikokortikoid Cevap Element” bağlayıcı bir DNA dizini olduğu yönündeki düşüncüyü kuvvetlendirmektedir. DNA dizin analizi ile elde edilen sonuçların teorik incelenmesi sonucunda; böyle bir TF bağlanma dizisinin tespit edilmesi, Prednisolon gibi Glikokortikoid ajanların direkt BAFF promotor üzerine etki edebileceğini göstermektedir. Buna rağmen; bu dizilerin ve Prednisolonun ekspresyon üzerindeki olası etkisi, ancak reporter assay ve EMSA teknikleri ile fonksiyonel olarak gösterilebilir.

6.2. İTP Hastalarının BAFF Promotor Dizileri İçerisinde Tespit Edilen SNP'lerin Değerlendirilmesi

İTP hastalarının BAFF promotor DNA dizisi içerisinde -871 C>T, -771 G>A, -661 A>G, -542 A>G ve -353 G>C, tek nükleotid polimorfizmleri tespit edilmiştir. -871 ve -771 pozisyonundaki SNP'ler; promotor üzerinde normalde olmayan, MZF-1-CD34- ve Est-vWF transkripsiyon faktör bağlanma dizileri oluşmasına neden olmaktadır. Hematolojik ve immün sistemde görevli olan bu TF'lerin İTP ve diğer otoimmün hastalıklarda önemli olabileceği düşünülmektedir. Öneri olarak; bu iki

faktörün BAFF sistemi üzerine etkileri ve İTP hastalığında alabilecekleri roller de daha ileriki çalışmalarda ortaya konmalıdır. -871 C>T SNP'si daha önce SLE ve primer Sjörge'n's Sendromu (pSS) hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda da tespit edildi (İttah et al., 2006). Bu değişim ile BAFF serum seviyesi arasında; istatistiksel anlamlılık sınırları içerisinde bir ilişki gösterilmiş olsa da, İTP özelinde yapılan bu çalışmada -871 C>T SNP'sinin BAFF ekspresyonu üzerine etkilerini sınamak için ilgili literatürde (Kawasaki et al., 2002; Gottenberg et al., 2006) belirtilen sayısal olarak yeterli SNP tespit edilemedi.

-771 G>A ve -542 A>G SNP'leri ilk defa bu çalışma ile tanımlanmış olan tek nükleotid polimorfizmleridir. Bu SNP'ler DNA dizi anlizi metodu ile tespit edilmiş olup, diğer SNP testleri ile de doğrulugu sınanmalıdır. Promotor -771 G>A SNP'si; promotor üzerinde yeni bir TF bağlanma noktasının oluşumunu sağlarken, -542 A>G için böyle bir özellik tespit edilememiştir. Bu iki SNP'nin BAFF ekspresyonuna etkisini *in vitro* belirlemek gerekmektedir. Ayrıca, İTP ya da diğer otoimmün hastalıklarla bu SNP'lerin ilişkisini belirlemek için, büyük hasta gruplarının SSCP gibi teknikler ile araştırılması ve SNP'lerin frekanslarının belirlenmesi önerilmektedir.

7. SONUÇ

Bu çalışma ile hematolojik sistemin otoimmün bir hastalığı olan İTP' de BAFF ekspresyonunun arttığı ilk defa gösterildi. Bu bağlamda; bundan sonraki çalışmalarda, artan BAFF ekspresyonunu sağlayan mekanizmaların neler olduğu detaylandırılmalıdır.

Çalışmaya ait diğer bir bulgu olarak; İTP hastalarının BAFF gen promotorları üzerinde beş farklı SNP tespit edildi. Bunlardan iki tanesi; şimdiye kadar gözlemlenmemiş olup, ilk defa bu çalışmada rapor edildi. Bu SNP'lerden iki tanesi, BAFF promotor bölgesinde yeni TF bağlanma dizileri oluşturmaktadır. Bu TF bağlantı noktalarının fonksiyonellik üzerine etkileri daha ileri düzeyde araştırılmalıdır.

Yapılan bu çalışmada, İTP hastalığının; birbirinden farklı efektör mekanizma ya da mekanizmaların oluşturduğu heterojen bir hastalık grubu olarak değerlendirilmesi gerektiği belirlendi. Bazı İTP'li hastalarda; T bağımlı efektör mekanizmalar ile trombositler yıkıma uğrarken, bazı hastalarda ise, yıkım sadece antikor bağımlı efektör mekanizmalar ya da bu iki efektör sistemin beraber katılımı tarafından gerçekleştirilir. Bu bağlamda, İTP patogenezinde görev alan efektör mekanizmalar ve bileşenleri ile ilgili yeni araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Abbas A. K., Lichtman H., Cellular and Molecular Immunology, 4. Updated edition. 411-431; London (2005).
2. Batten M., Groom J., Cachero T.G., Qian F., Schneider P., Tschopp J. Browning J.L., Mackay F. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med, 192:1453-65 (2000).
3. Bertrand H., Lionel A., Christine A., Vicent K. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. International Immunology, 16(3):476-475 (2004).
4. Beutler E., Lichtman M.A., Barry S.C., Kipps T.J., Seligsohn U. Williams Hematology. Sixty Editions, 1513-1539 (2001).
5. Black C.A., Delayed Type Hypersensitivity: Current Theories with an Historic Perspective. Dermatology Online J., 5(1):7 (1999).
6. Bluestein H.G. Heterogeneous neurocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol., 35(2):210-7 (1979).
7. Bodmer J.L., Schneider P., Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci., 27:19-26 (2002).
8. Cannon J.P., Haire R.N., Rast J.P., Litman G.W. The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. Immunol. Rev., 200:12–22 (2004).
9. Chang M., Nakagawa P.A., Williams S.A., Schwartz M.R., Imfeld K.L., Buzby J.S., Nugent D.J. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis *in vitro*. Blood, 102(3):887-95 (2003).
10. Cines D.B., Blanchette V.S. Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med., 346:995-1008 (2002).
11. Claudio J.O., Masih-Khan E., Tang H., Goncalves J., Voralia M., Li Z.H., Nadeem V., Cukerman E., Francisco-Pabalan O., Liew C.C., Woodgett J.R., Stewart A.K. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. Blood, 100(6):2175-86 (2002).

12. Coope H.J., Atkinson P.G., Huhse B., Belich M., Janzen J., Holman M.J., Klaus G.G., Johnston L.H., Ley S.C. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.*, 21:5375–85 (2002).
13. Craft J., Fatenejad S. Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity. *Arthritis & Rheumatism*, 40(8):1374-82 (1997).
14. Croxford J.L., Olson J.K., Calenoff M.A., Dal Canto M.C., Miller S.D. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 108:311-318 (2001).
15. Del Prete G., Maggi E., Romagnani S. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Laboratory Investigation*, 70:299-306 (1994).
16. den Dunnen J.T., Antonarakis S.E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestion to Describe Complex Mutations: A Discussion, *Human Mutation*. 15:7-12 (2000).
17. Devendra D., Liu E., Eisenbarth G.S., Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*, 328:750-754 (2004).
18. Do R.K., Hatada E., Lee H., Tourigny M.R., Hilbert D., Chen-Kiang S., Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med*, 192(7):953–64 (2000).
19. Douglas N.B., Cines M.D., Victor S., Blanchette M.B., Chronic immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 346:995-1008 (2002).
20. Dunnen J.T. and Stylianou E.A., Mutation Nomenclature Extensions and Suggestion to Describe Complex Mutations: A Discussion, *Human Mutation*. 15:7.12 (2000).
21. Feldmann J.L., Becker M.J., Moutsopoulos H., Fye K., Blackman M., Epstein W.V., Talal N. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune diseases. *J Clin Invest.*, 58(1): 173–179 (1976).
22. Foster C.B., Zhu S., Erichsen H.C., Lehrnbecher T., Hart E.S., Choi E., Stein S., Smith M.W., Steinberg S.M., Imbach P., Kuhne T., Chanock S.J. Early Chronic ITP Study Group Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fcgamma receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol.*, 113(3):596-9 (2001).
23. GeneCard, Weizmann Institute, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF13B&search=TNFSF13B>, (2006).

24. George J.N. The origin and significance of platelet IgG. In: Kunicki T.J., George J.N. (eds). *Platelet immunobiology, Molecular and Clinical Aspects*. Philadelphia: Lippincott, 305-336(1989).
25. George J.N., Raskob G.E. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A concise summary of the pathophysiology and diagnosis in children and adults. *Semin Hematol.*, 35:5-8 (1998).
26. Gerald J. Prud'homme, Immune-Mediated Tissue Injury (Hypersensitivity Reactions), <http://www.medicine.mcgill.ca/mjm/issues/v01n01/bsr.html>, (02.05.2006).
27. Gottenberg J.E., Sellam J., Ittah M., Lavie F., Proust A., Zouali H., Sordet C., Sibia J., Kimberly R.P., Mariette X., Miceli-Richard C. No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 8:1 (2006).
28. Groom J., Kalled S.L., Cutler A.H., Olson C., Woodcock S.A., Schneider P., Tschopp J., Cachero T.G., Batten M., Wheway J., Mauri D., Cavill D., Gordon T.P., Mackay C.R., Mackay F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest.*, 109:59–68 (2002).
29. Gross J.A., Johnston J., Mudri S., Enselman R., Dillon S.R., Madden K., Xu W., Parrish-Novak J., Foster D., Lofton-Day C., Moore M., Littau A., Grossman A., Haugen H., Foley K., Blumberg H., Harrison K., Kindsvogel W., Clegg C.H. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, 404:950–95 (2000).
30. Harrington W.J., Minnich V., Hollingsworth J.W., Moore C.V. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*, 38:1-10 (1951).
31. Hatzoglou A., Roussel J., Bourgeade M.F., Rogier E., Madry C., Inoue J., Devergne O., Tsapis A. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.*, 165:1322-30 (2000).
32. He B., Raab-Traub N., Casali P., Cerutti A. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-

- independent Ig heavy chain class switching. *J. Immunol.*, 171:5215-5224 (2003).
33. Hentges K.E., Yarlagadda S.P., Justice M.J. Tnfrsf13c (Baffr) is mis-expressed in tumors with murine leukemia virus insertions at Lvis22. *Genomics*, 80:204–12 (2002).
 34. Horwitz M.S., Bradley L.M., Harbertson J., Krah T., Lee J. Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.*, 4:781-785 (1998).
 35. Horwitz M.S., Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev.*, 169:241-253 (1999).
 36. Huang X., Di Liberto M., Cunningham A.F., Kang L., Cheng .S, Ely S., Liou H.C., MacLennan I.C., Chen-Kiang S. Homeostatic cell-cycle control by BLyS: Induction of cell-cycle entry but not G1/S transition in opposition to p18INK4c and p27Kip1. *PNAS USA* 101(51):17789-94 (2004).
 37. Huard B., Arlettaz L., Ambrose C., Kindler V., Mauri D., Roosnek E., Tschopp J., Schneider P., French L.E. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *International Immunol.*, 16(3): 476-475 (2004).
 38. Irie J., Ridgway W.M. A modular theory of autoimmunity. *Keio J Med.*, 54 (3): 121–126 (2005).
 39. Ittah M., Miceli-Richard C., Eric Gottenberg J., Lavie F., Lazure T., Ba N., Sellam J., Lepajolec C., Mariette X. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 8(2):R51 (2006).
 40. Jennette J.C., Falk R.J., Wilkman A.S. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am. J. Pathol.*, 135(5):921-30 (1989).
 41. Jennette J.C., Xiao H., Falk R.J. Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(5):1235-42 (2006).
 42. Kawasaki A., Tsuchiya N., Fukazawa T., Hashimoto H., Tokunaga K. Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with SLE and RA. *Genes Immun.*, 3:424-429 (2002).

43. Kawasaki A., Tsuchiya N., Fukazawa T., Hashimoto H., Tokunaga K. Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun.*, 2:276–9 (2001).
44. Khare S.D., Sarosi I., Xia X.Z., McCabe S., Miner K., Solovyev I., Hawkins N., Kelley M., Chang D., Van G., Ross L., Delaney J., Wang L., Lacey D., Boyle W.J., Hsu H. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *PNAS USA*, 97:3370-5 (2000).
45. Kiefel V., Santoso S., Weisheit M., Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of Platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 70:1722–1726., (1987).
46. Kuwana M., Kaburaki J., Kitasato H., Kato M., Kawai S., Kawakami Y., Ikeda Y. Immundominant epitopes and glycoprotein Iib-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombositopenic purpura. *Blood*, 98(1):130-139 (2001).
47. Laabi Y., Gras M.P., Carbonnel F., Brouet J.C., Berger R., Larsen C.J., Tsapis A. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO*, 11:3897–904 (1992).
48. Lampert P.W., Sims J.K., Kniazeff A.J. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta Neuropathol.*, 24:76-85 (1973).
49. Leeuwen E.F., van der Ven J.T.H., Engelfriet C.P., von dem Borne A.E.G. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 59:23-26 (1982).
50. Lilleyman J., Hann I., Blanchette V., Imbach P. Immune thrombocytopenic purpura. In: *Pediatric Hematology*, second ed. London, Churchill Livingstone Harcourt Publishers Ltd; 437-453 (1999).
51. Litinskiy M.B., Nardelli B., Hilbert D.M., He B., Schaffer A., Casali P., Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin Class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol.*, 3(9): 822–9 (2002).
52. Mackay F., Ambrose C. The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14:311-324 (2003).

53. Mackay F., Woodcock S.A., Lawton P., Ambrose C., Baetscher M., Schneider P., Tschopp J., Browning J.L. Mice transgenic for BAFF develops lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.*, 190:1697–710 (1999).
54. Male D. Hypersensitivity-type II. In: *Immunology*, Roitt I., Brostoff J., Male D., editors. St. Louis: The C.V. Mosby Co. (1994).
55. Matsushita T., Hasegawa M., Yanaba K., Koder M., Takehara K., Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 54(1):192-201 (2006).
56. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.*, 37:239-248 (2000).
57. Meyer A., Zardoya R. Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34:311–38 (2003).
58. Miller S.D., Vanderlugt C.L., Begolka W.S., Pao W., Yauch R.L., Neville K.L., Katz-Levy Y., Carrizosa A., Kim B.S. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.*, 3:1133-1136 (1997).
59. Min Zhang, King-Hung Ko, Queenie Lai Kwan Lam, Cherry Kam Chun Lo et al., Expression and function of TNF family BAFF in the development of autoimmune arthritis, *International Immunol.*, 17(8):1081-1092 (2005).
60. Moore P.A., Belvedere O., Orr A., Pieri K., LaFleur D.W., Feng P., Soppet D., Charters M., Gentz R., Parmelee D., Li Y., Galperina O., Giri J., Roschke V., Nardelli B., Carrell J., Sosnovtseva S., Greenfield W., Ruben S.M., Olsen H.S., Fikes J., Hilbert D.M. BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 285:260–3 (1999).
61. Mosmann T.R. T lymphocyte subsets, cytokines and effector functions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 664:89-92 (1992).
62. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136:2348-2357 (1986).

63. Nardelli B., Belvedere O., Roschke V., Moore P.A., Olsen H.S., Migone T.S., Sosnovtseva S., Carrell J.A., Feng P., Giri J.G., Hilbert D.M. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, 97:198–204 (2000).
64. Nemazee D., Kouskoff V., Hertz M., Lang J., Melamed D., Pape K., Retter M. B-cell-receptor-dependent positive and negative selection in immature B cells. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 245:57–71 (2000).
65. Nomura S., Matsuzaki T., Ozaki Y., Yamaoka M., Yoshimura C., Katsura K., Xie G.L., Kagawa H., Ishida T., Fukuhara S. Clinical significance of HLA-DRB1*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 91:3616-3622 (1998).
66. Novak A.J., Bram R.J., Kay N.E., Jelinek D.F. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood*, 100:2973–9 (2002).
67. Olson J.K., Croxford J.L., Calenoff M.A., Dal Canto M.C., Miller S.D. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, 108:311-318 (2001).
68. Olson J.K., Croxford J.L., Miller S.D. Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. *Viral Immunol.*, 14:227-250 (2001).
69. Olsson B., Andersson P.O., Jernas M., Jacobsson S., Carlsson B., Carlsson L.M., Wadenvik H. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat. Med.*, 9(9):1123-4 (2003).
70. Ören H. İdiyopatik Trombositopenik Purpura Tani ve Tedavi. XXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi, Mezuniyet Sonrasi Egitim Kursu, 99–110 (2002).
71. Özbal Y. Temel İmmünoloji, 1.Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, 191 (1994).
72. Pancer Z., Cooper M. D. The Evolution of Adaptive Immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 24:497-519 (2006).
73. PDB, Protein Databank, <http://www.pdb.org>. (06.05.2006).
74. Powell H.C., Lampert P.W. Oligodendrocytes and their myelinplasma membrane connections in JHM mouse hepatitis virus encephalomyelitis. *Lab Invest.*, 33:440-445 (1975).
75. Ramanujam M., Wang X., Huang W., Liu Z., Schiffer L., Tao H., Frank D., Rice J., Diamond B., Yu K.O., Porcelli S., Davidson A. Similaritis and

- differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J. Clin.*, 116(3):724-34 (2005).
76. Redondo M.J., Rewers M., Yu L., Garg S., Pilcher C.C., Elliott R.B., Eisenbarth G.S. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1A diabetes: prospective twin study. *BMJ*, 323:997-8 (1999).
 77. Rolink A.G., Tschopp J., Schneider P., Melchers F. BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells. *Eur J Immunol.*, 32:2004–10 (2002).
 78. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann. Rev. Immunol.*, 12:227-257 (1994).
 79. Rose N.R. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol.*, 10(1):5-13 (1998).
 80. Satoh T., Pandey J.P., Okazaki Y., Yasuoka H., Kawakami Y., Ikeda Y., Kuwana M. Single nucleotide polymorphisms of the inflammatory cytokine genes in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, 124(6):796-801 (2004).
 81. Schiemann B., Gommerman J.L., Vora K., Cachero T.G., Shulga-Morskaya S., Dobles M., Frew E., Scott M.L. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293:2111–4 (2001).
 82. Schneider P., MacKay F., Steiner V., Hofmann K., Bodmer J.L., Holler N, Ambrose C., Lawton P., Bixler S., Acha-Orbea H., Valmori D., Romero P., Werner-Favre C., Zubler R.H., Browning J.L., Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor (TNF) family, stimulates B cell growth. *J. Exp. Med.*, 189:1747–56 (1999).
 83. Semple J.W., Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 78(10): 2619-25 (1991).
 84. Shu H.B., Hu W.H., Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J. Leukoc. Biol.*, 65(5):680-3 (1999).
 85. Shulman N.R., Marder V.J., Weinrach R.S. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura: physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann. NY Acad. Sci.*, 124:499-542 (1965).

86. Singleton E.M., Hutson S.E. Anterior uveitis, inflammatory bowel disease, and ankylosing spondylitis in a HLA-B27-positive woman. *South Med. J.*, 99(5):531-3 (2006).
87. Strasser A., Whittingham S., Vaux D.L., Bath M.L., Adams J.M., Cory S., Harris A.W. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *PNAS*, 88:8661–5 (1991).
88. Susan M., Chen M.D. Serum Sickness, emedicine from MD, <http://www.emedicine.com/emerg/topic526.htm>, (2005).
89. Sutor A.H., Harms A., Kaufmehl K. Acute immune thrombocytopenia (ITP) in childhood: retrospective and prospective survey in Germany. *Semin Thromb Haemost.*, 27:253-267 (2001).
90. Taqueti V.R., Mitchell R.N. Lichtman AH. Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Ann. Rev. Physiol.*, 68:67-95 (2006).
91. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Chapter 148, <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section12/chapter148/148d.jsp>, (2006).
92. Thompson J.S., Bixler S.A., Qian F., Vora K., Scott M.L., Cachero T.G., Hession C., Schneider P., Sizing I.D., Mullen C., Strauch K., Zafari M., Benjamin C.D., Tschopp J., Browning J.L., Ambrose C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*, 293:2108–11 (2001).
93. van Leeuwen E.F., van der Ven J.T., Engelfriet C.P., von dem Borne A.E. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 59:23-26 (1982).
94. Van Arsdale T.L., VanArsdale S.L., Force W.R., Walter B.N., Mosialos G., Kieff E., Reed J.C., Ware C.F. Lymphotoxin-beta receptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor. *PNAS*, 94:2460–5 (1997).
95. Viviany R.T., Richard N.M, and Andrew H.L., Protecting The Pump: Controlling Myocardial Inflammatory Responses. *Ann. Rev. Physiol.*, Vol. 68, 67-95 (2005).
96. Von Bulow G.U., Bram R.J. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*, 278:138–41 (1997).

97. Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I., Schmucker D. Extensive diversification of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309:1874–78 (2005).
98. Xia X.Z., Treanor J., Senaldi G., Khare S.D., Boone T., Kelley M., Theill L.E., Colombero A., Solovyev I., Lee F., McCabe S., Elliott R., Miner K., Hawkins N., Guo J., Stolina M., Yu G., Wang J., Delaney J., Meng S.Y., Boyle W.J., Hsu H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J. Exp. Med.*, 192:137–43 (2000).
99. Xiao G., Harhaj E.W., Sun S.C. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF κ B-2 p100. *Mol. Cell*, 7:401–9 (2001).
100. Xu L., Wu M., Hu J., Zhai Z., Shu H. Identification of downstream genes up-regulated by tumor necrosis factor family member TALL-1. *J. Leukoc. Biol.*, 72:410–6 (2002).
100. Yu X.Q., Kanost M.R. Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *Eur. J. Biochem.*, 269:1827–34 (2002).
101. Yusuf Özbal, Temel İmmünoloji, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, 191 (1994).
102. Zhang F., Chu X., Wang L., Zhu Y., Li L., Ma D., Peng J., Hou M. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haematol.*, 76(5):427-31 (2006).
103. Zhang M., Ko K.H., Lam Q.L., Lo C.K., Srivastava G., Zheng B., Lau Y.L., Lu L. Expression and function of TNF family BAFF in the development of autoimmune arthritis. *International Immunol.*, 17(8):1081-92 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgi

Adı Soyadı : Gürkan BAL
 Doğum Yeri ve Tarih : Trabzon / 02.05.1978
 Adres : Charite Universitätsmedizin
 Campus Westend
 Spandauer Damm 130
 Forschungshaus Haus 40 Zimmer 126
 14050 Berlin Deutschland

Eğitim

2004-	Magdeburg Üniversitesi	Magdeburg
	Tıp Fakültesi (4. Sınıf)	
1994 – 1998	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	İstanbul
	Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	

Dil

Almanca, İngilizce

Profesyonel Deneyim

2005-	Berlin Charite Tıp Üniversitesi	Berlin/Almanya
	Transfüzyon Enstitüsü	
	Moleküler Biyoloji Lab.	
1997 – 2001	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	İstanbul
	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.B.D	
	Biyokimya Laboratuvarı	
1994 – 1998	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	İstanbul
	Biyokimya A.B.D.	
	Biyokimya Lab.	
1994 – 1999	Alman Hastanesi Laboratuvarı	İstanbul
1994 – 1999	Özel Rutin Biyokimya Lab	İstanbul