

**OTOİMMÜN TİROİD HASTALIKLARINDA  
TİROGLOBULİN GEN POLİMORFİZMİ VE  
HLA-DR3 İLE YAYGIN TİROGLOBULİN VARYANLARI  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN SAPTANMASI**

**E. Sacide KOZAN**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Necat İMİRALIOĞLU**

**Tez No: 2011-01**

**2011-AFYONKARAHİSAR**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OTOİMMÜN TİROİD HASTALIKLARINDA TİROGLOBULİN**  
**GEN POLİMORFİZMİ VE**  
**HLA-DR3 İLE YAYGIN TİROGLOBULİN VARYANLARI**  
**ARASINDAKİ İLİŞKİNİN SAPTANMASI**

**E. Sacide KOZAN**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon**  
**Birimi Tarafından 08.TIP.23 Proje Numarası ile Desteklenmiştir**

**Tez No: 2011-01**

**2011- AFYONKARAHİSAR**

## KABUL VE ONAY

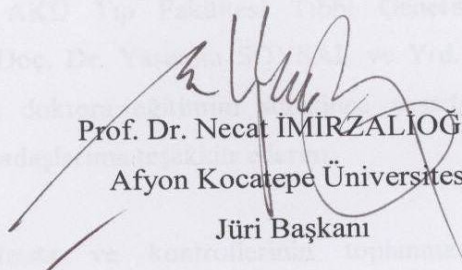
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

### Tıbbi Genetik Programı

çerçevesinde yürütülmüş bu tez, aşağıdaki jüri tarafından

**Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi. 14.01.2011

  
Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU

Afyon Kocatepe Üniversitesi

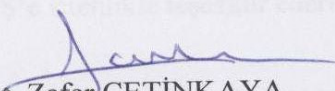
Jüri Başkanı

Doç Dr. Mehmet YILMAZER  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

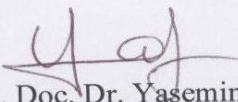
Üye

Doç. Dr. M. Ali ERGÜN  
Gazi Üniversitesi

Üye


  
Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Yasemin SOYSAL  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi E. Sacide KOZAN'ın, "Otoimmün Tiroid Hastalıklarında Tiroglobulin Gen Polimorfizmi ve HLA-DR3 ile Yaygın Tiroglobulin Varyantları Arasındaki İlişkinin Saptanması" başlıklı tezi 27.01.2011 günü saat 10:00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

  
Doç Dr. Esmâ KOZAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince, gelişim fırsatlarını değerlendirebilmem ve tez hazırlık sürecinde karşılaştığım zorlukların üstesinden gelebilmem için anlayış, hoşgörü ve sınırsız desteğini esirgemeyen danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU'na en içten teşekkürlerimi iletirim. Doktora eğitimimi gerçekleştirdiğim AKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Yasemin SOYSAL ve Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT'a, ayrıca doktora eğitimim süresince yaşadığımız güzel paylaşımlarla hatırlayacağım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin hasta ve kontrollerinin toplanması, örneklerin saklanması aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji Kliniği'nden Doç. Dr. Yalçın ARAL ve Uzm Dr. Ahmet YILDIRIM'a, Dahiliye 2 Polikliniği'nden Uzm. Dr. Zafer Aydın ECEMİŞ'e, Biyokimya Laboratuvarı'ndan Doç. Dr. Doğan YÜCEL ve Uzm. Dr. Mehmet ŞENEŞ'e içtenlikle teşekkür ederim

Tez çalışmalarımın sağlıklı bir şekilde başlaması ve sürdürülmesi için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü'nde kaldığım süre boyunca, bana öğrenme ve uygulama imkanı tanıyan değerli hocamız Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye, bilgi ve birikimlerini samimiyetle paylaşarak elinden gelen yardımı esirgemeyen Öğr. Grv. Dr. H. İlke ÖNEN'e, zorlandığımda rahatlıkla yardım alabildiğim Arş. Grv. Dr. Ebru ALP ve Arş. Grv. Dr. Akın YILMAZ'a sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Tezimin istatistik analizlerinde bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen AKÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Nurhan DOĞAN'a, istatistik analizlerin tamamlanması ve sonuçların yorumlanması aşamasında, yol gösterici yaklaşımıyla desteklerini esirgemeyen GATA Biyoistatistik Bölümü'nden Öğr. Grv. Dr. Mesut AKYOL'a en içten teşekkürlerimi iletirim.

Tez alışmaları ve yazım aşamasında, bilgi ve tecrübeleriyle beni yalnız bırakmayan, desteğini her zaman üzerimde hissettiğim eşim Uzm. Tbp. Yzb. Salih KOZAN'a, son olarak ta bugünlere gelebilmemde sonsuz emek sahibi annem Fatma AğLAYAN ve babam Ahmet AğLAYAN'a sevgilerimi iletir, sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>Kabul ve Onay</b> .....	<b>ii</b>
<b>Önsöz</b> .....	<b>iii</b>
<b>İçindekiler</b> .....	<b>v</b>
Simgeler ve Kısaltmalar .....	vii
Şekiller .....	x
Tablolar .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. OTH'na Giriş .....	4
1.2. OTH'nda Patogenez .....	5
1.3. OTH'nda Genetik Faktörler .....	7
1.3.1. İmmün Sistemle İlişkili Genler.....	8
1.3.2. Tiroid Spesifik Genler.....	16
1.4. OTH'nda Çevresel Faktörler .....	20
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>24</b>
2.1. Araç ve Gereçler.....	24
2.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri .....	25
2.3. Genomik DNA İzolasyonu .....	27
2.4. TG Gen Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Tekniği ile Belirlenmesi .....	27
2.4.1. E10SNP24 ve E10SNP158 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi .....	31
2.4.2. E12SNP Polimorfizminin Belirlenmesi .....	34
2.4.3. E21SNP Polimorfizminin Belirlenmesi .....	36
2.4.4. E33SNP Polimorfizminin Belirlenmesi .....	38
2.5. HLA-DR3 Allelinin PCR-SSP Tekniği ile Belirlenmesi .....	40
2.6. DNA Dizi Analizi .....	42
2.7. İstatistik Analizleri .....	44
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>45</b>

3.1. TG Geninin OTH ile İlişkisi .....	39
3.2. TG Geninin GH ve HT Hastalığı ile İlişkisi .....	47
3.3. GH'nda TG Gen Polimorfizmleri ile HLA-DR3 İlişkisi .....	51
3.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları .....	53
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>54</b>
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>62</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>64</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

**A:** Adenin / Adenine

**Ala:** Alanin / Alanine

**Anti-Tg:** Tiroglobulin proteinine özgül antikor

**APC:** Antigen Presenting Cell

**Arg:** Arjinin / Arginine

**bç:** Baz çifti

**Bpu10I:** Bacillus pumilus bakterisinin RFL 10 suşundan elde edilen 1 numaralı restriksiyon enzimi

**Bpu 1102I:** Bacillus pumilus bakterisinin RFL 1102 suşundan elde edilen 1 numaralı restriksiyon enzimi

**C:** Sitozin / Cytosine

**cAMP:** Cyclic Adenosine Monophosphate

**CD4:** Cluster of Differentiation 4

**CD8:** Cluster of Differentiation 8

**CD28:** Cluster of Differentiation 28

**CTLA-4:** Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4

**dH<sub>2</sub>O:** Distile su

**dNTP:** Deoksi Nükleotid Trifosfat

**DZ:** Dizigot

**DMSO:** Dimetil Sülfoksit

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**EDTA:** Etilen Tetra Asetik Asit

**EtBr:** Etidyum Bromür

**FCRL-3:** Fc receptor like-3

**G:** Guanin / Guanine

**GA:** Güven Aralığı

**GH:** Graves Hastalığı

**Glu:** Glutamin / Glutamine

**HLA:** Human Leukocyte Antigen

**HSP-70:** Heat Shock Proteins-70



- SLAP:** Human Src like Adaptor Protein
- HT:** Hashimoto Tiroiditi
- ICOS:** Inducible Costimulator Protein
- IDDM:** Insulin Dependent Diabetes Mellitus
- IgG:** İmmünglobulin G
- IgH:** İmmünglobulin G molekülündeki ağır zincir
- IL-1:** Interleukin-1
- IL-2:** Interleukin-2
- IL-4:** Interleukin-4
- IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry
- kDA:** Kilo dalton
- kb:** Kilo baz
- KOT:** Kronik Otoimmün Tiroidit
- LOD:** Logarithm of odds
- LYP:** Lymphoid Thyrosine Phosphatase
- MgCl<sub>2</sub>:** Magnezyum Klorür
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- mRNA:** Mesajcı Ribonükleik Asit
- MspI:** Moraxella türlerinden elde edilen 1 numaralı restriksiyon enzimi
- MZ:** Monozigot
- NK:** Natural Killer Cell
- OTH:** Otoimmün Tiroid Hastalıkları
- PAX-8:** Paired Box-8
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PCR-SSP:** Polymerase Chain Reaction-Sequence Spesific Primers
- Ppu21I:** Pseudomonas putida bakterisinin RFL 21 suşundan elde edilen 1 numaralı restriksiyon enzimi.
- PTPN-22:** Protein Thyrosin Phosphatase-22
- RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism
- SNP:** Single Nucleotide Polymorphism
- SNPs:** Single Nucleotide Polymorphisms
- STR:** Short Tandem Repeat

**STRs:** Short Tandem Repeats

**T:** Timin / Thymine

**TaaI :** *Termus aquaticus* bakterisinden elde edilen 1 numaralı restriksiyon enzim

**Taq:** *Termus aquaticu*

**TCR:** T Cell Receptor

**Tg:** Thyroglobulin (protein)

**TG:** Thyroglobulin (gen)

**Th1:** T hepler 1

**Th2:** T hepler 2

**Thyr:** Threonine

**Tm:** Temperature Melting

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$

**TPO:** Thyroid Peroxidase

**TRR:** Tahmini Rölatif Risk

**TSH:** Thyroid Stimulating Hormone

**TSHR:** Thyroid Stimulating Hormone Receptor

**TTF-1:** Thyroid Transcription Factor-1

**TTF-2:** Thyroid Transcription Factor-1

**T4 :** Tiroksin

**U:** Urasil / Uracil

**UV:** Ultraviyole

**1p13:** Kromozom 1'in kısa kolundaki 13. bölge

**2q33:** Kromozom 2'nin uzun kolundaki 33. bölge

**3' UTR:** 3' Untranslated Region

**5' UTR:** 5' Untranslated Region

**6p21:** Kromozom 6'nın kısa kolundaki 21. bölge

**8q24:** Kromozom 8'in uzun kolunki 24. bölge

## ŞEKİLLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. E10SNP24 Bölgesinin Bpu 1102I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	33
Şekil 2.2. E10SNP158 Bölgesinin Bpu 10I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %3'lük Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	34
Şekil 2.3. E12SNP Bölgesinin Ppu21I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	36
Şekil 2.4. E21SNP Bölgesinin MspI ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	38
Şekil 2.5. E33SNP Bölgesinin TaaI ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	40
Şekil 2.6. PCR-SSP HLA-DR Analiz Yönteminde, HLA-DR3 Allelin Varlığını Gösteren %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü .....	42
Şekil 2.7. TG geni E10SNP24 T/G , E10SNP158 T/C, E12SNP A/G, E21SNP T/C ve E33SNP T/C Polimorfizmlerinin DNA Dizi Analizi Görüntüsü .....	43

## TABLOLAR

### Sayfa

Tablo 1.3.1. Tanımlanmış HLA Sınıf I ile Sınıf II Genlerinin Rutin Olarak Tiplendirilme Durumları .....	11
Tablo 1.2. İnsanda TG Geni Polimorfizmleri .....	17
Tablo 2.1. TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Hedef Bölgelerin, PCR Reaksiyonuyla Çoğaltılmasında Kullanılan Primer Dizileri ve PCR Ürünü Uzunlukları .....	28
Tablo 2.2. TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmleri İçin Beklenen Baz Değişimleri ve Bu Değişiklikleri Tanıyan Restriksiyon Enzimlerinin Kesim Bölgeleri .....	29
Tablo 2.3. TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Enzim Kesim Reaksiyonu Bileşenleri .....	30
Tablo 2.4. TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Restriksiyon Enzimlerine Ait İnkübasyon Sıcaklıkları ve Beklenen Enzim Kesim Ürünlerinin Uzunlukları .....	31
Tablo 2.5. TG Geni 10. Ekzon Bölgesindeki, E10SNP24 ve E10SNP158 Polimorfizmlerini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri .....	32
Tablo 2.6. TG Geni 10. Ekzon Bölgesindeki, E10SNP24 ve E10SNP158 Polimorfizmlerini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı .....	32
Tablo 2.7. TG Geni 12. Ekzon Bölgesindeki, E12SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı.....	35
Tablo 2.8. TG Geni 12. Ekzon Bölgesindeki, E12SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan	

PCR Reaksiyon Programı .....	35
Tablo 2.9. TG Geni 21. Ekzon Bölgesindeki, E21SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Protokolü .....	37
Tablo 2.10. TG Geni 21. Ekzon Bölgesindeki, E21SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı .....	37
Tablo 2.11. TG Geni 33. Ekzon Bölgesindeki, E33SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı .....	39
Tablo 2.12. TG Geni 33. Ekzon Bölgesindeki, E33SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı .....	39
Tablo 2.13. PCR-SSP Yönteminde, HLA-DR Analizi İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri .....	40
Tablo 2.14. PCR-SSP Yönteminde, HLA-DR Analizi İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı .....	41
Tablo 3.1. OTH ve Kontrol Gruplarında, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Allel ve Genotip Dağılımları .....	46
Tablo 3.2. OTH ve Kontrol Gruplarında E33SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması .....	47
Tablo 3.3. GH, HT ve Kontrol Gruplarında, TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Allel ve Genotip Dağılımları .....	49
Tablo 3.4. GH ve Kontrol Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması .....	50
Tablo 3.5. HT ve Kontrol Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması .....	50
Tablo 3.6. GH ve HT Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması .....	51
Tablo 3.7. GH ve Kontrol gruplarında HLA-DR3 Varlığının	

Karşılaştırılması .....	52
Tablo 3.8. HLA-DR3 (+) Graves Hastaları ve HLA-DR3 (+) Kontrollerde TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin HLA-DR3 ile Birlikteliği .....	52

## 1. GİRİŞ

Otoimmün Tiroid Hastalıkları (OTH), diğer organ spesifik endokrinopatilerde görüldüğü gibi poligenik, multifaktöriyel bir hastalık grubu olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, genetik faktörlerin OTH'nın patolojisindeki önemini vurgulamakta ve özellikle Graves Hastalığı'nda (GH), genetik duyarlılığın %80 oranında olduğu ifade edilmektedir (Prummel, 2004).

Dünya'da, tiroid hastalıklarının en sık nedeninin iyot eksikliği olduğu; iyot kullanımının yeterli olduğu bölgelerde ise OTH'ın yaygın olduğu bilinmektedir (Ata, 1999). Ülkemizde ise, endemik guatr oranının %30,5 olarak belirlendiği ve 1985'te Avrupa Tiroid Birliği tarafından yayınlanan rapora göre Türkiye'nin, endemik guatr sorunu yaşayan ülkeler arasında gösterildiği ifade edilmektedir (Urgancıoğlu, 1988; Koloğlu,1996).

Tiroid hastalıklarının epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda, farklı tiroid hastalık gruplarının prevalansı ve insidansı değerlendirilmiş olup (Tunbridge and Caldwell, 1991; Vonderpump, 1995; Wiersinga, 1995; Vonderpump and Tunbridge, 1996; Vonderpump and Tunbridge, 2002); genel olarak hipotiroidizm prevalansının erkeklerde 0 ve 7,8/1000 arasında, kadınlarda ise 0 ve 20,5/1000 arasında bulunduğu; hipertiroidizmin ise kadınlarda 2,0 ve 19,4/1000 arasında olduğu belirtilmektedir (Vonderpump and Tunbridge, 1996).

OTH insidansı kapsamlı ve sistematik değerlendirildiğinde, hipotiroidizm insidansının kadınlarda 350/100 000/yıl, erkeklerde ise 80/100 000/yıl ve hipertiroidizm insidansının kadınlarda 80/100 000/yıl, erkeklerde ise 8/100 000/yıl olduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlara göre, OTH insidansının kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görüldüğüne dikkat çekilmektedir (McGrogan, 2008). İyot

eksikliğinin görüldüğü birbirinden farklı coğrafyada yer alan popülasyonlarda, GH ile Hashimoto Tiroiditi (HT) hastalıklarının prevalansı ve insidansı karşılaştırıldığında, bu hastalıkların gelişiminde kalıtımın etkisinin büyük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çünkü, bu popülasyonların farklı çevresel koşullara sahip olduğu (iyot faktörü dışında) belirtilmiş olup; farklı beyaz ırk popülasyonlarında, OTH için ortak duyarlılık genlerinin bulunmasının da önemli bir gösterge olabileceği ifade edilmiştir (Brownlie and Welsh, 1990; Jacobson, 1997; Canaris, 2000; Tomer and Davies, 2003).

Hastalıkların tanısına yönelik son yıllarda kaydedilen ilerlemelerin, OTH gibi kompleks hastalıklarla ilişkili genlerin belirlenebilmesini mümkün kıldığı bilinmektedir. OTH etiyolojisinde yer alan genlerin araştırılmasında, genellikle bağlantı analizleri, asosiasyon analizleri, aday gen analizleri ve tüm genom tarama yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir (Tomer and Davies, 2003; Hadj-Kajem, 2009).

Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) olarak adlandırılan gen bölgeleri, İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) adı verilen glikoproteinleri kodlamaktadır. Beyaz ırkta, HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) gen bölgesinin görülme sıklığının normal popülasyonda %15-30, Graves hastalarında ise %40-50 oranında olduğu bildirilmektedir (Farid, 1981; Tomer and Davies, 2003). HT'nde HLA allellerinin rolü hakkında GH'ndaki kadar kesin veriler bulunmamakla birlikte, beyaz ırkta, guatrla birlikte seyreden HT'nin HLA-DR5 (Farid, 1981) ve atrofik HT'nin HLA-DR3 (Moens, 1978) ile ilişki olduğu belirtilmektedir (Tandon, 1991; Ban, 2002a; Hadj-Kajem, 2009).

MHC dışında, OTH gelişiminden sorumlu olduğu belirlenen genlerden bazılarının sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4), tiroid stimüle eden hormon reseptörü (TSHR) geni, tiroglobulin (TG), tiroid peroksidaz (TPO) ve tirozin fosfataz protein-22 (PTPN-22) olduğu bildirilmektedir (Jacobson and Tomer, 2007).



Otoimmüniteye bağlı gelişen tiroid düzensizliklerinden sorumlu genlerle ilişkili olarak yapılan bağlantı ve asosiasyon analizleri sonucunda, 8. kromozom (8q24) üzerinde yer alan TG geninin, tiroid spesifik bir yatkınlık geni olduğuna işaret edilmektedir (Sakai, 2001; Tomer, 2003; Tomer and Greenberg, 2004). TG geninin, 660 kDA büyüklüğünde ve homodimerik yapıda tiroglobulin (Tg) proteinini kodladığı; otoantijen özelliği gösteren bu proteine karşı gelişen anti tiroglobulin (anti-Tg) antikörlerinin ise hem GH, hem de HT tanısı almış hastalarının serum örneklerinde tespit edilebildiği belirtilmektedir (Hadj-Kajem, 2009; Brown, 2009). Genetik duyarlılığı olan fareler üzerinde yapılan deneylerde, Tg immünizasyonunun Deneysel Otoimmün Tiroid'e (DOT) neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, OTH'nda Tg duyarlılığı rolünün olabileceğini gösteren kanıtların artmakta olduğu vurgulanmaktadır (Brown, 2009). Tg dışında, OTH'na spesifik olarak eksprese olduğu bilinen diğer otoantijenleri kodlayan TPO ve TSHR genleri ile ilişkili olarak yapılan çalışmalarda, bu genlerle OTH arasında bağlantı bulunmadığı belirtilmektedir (Pirro, 1995; De Roux, 1996; Tomer, 1997; Ban, 2002b). Bu sebeple TG geni, OTH'na genetik yatkınlıktaki rolü belirlenmiş ilk tiroid spesifik gen olarak tanımlanmaktadır (Ban, 2004b).

Bu çalışmaya, GH ve HT tanısı almış hastalar ile tiroid hastalıkları görülmeyen sağlıklı bireyler dahil edilerek; TG geni 10. ekzonundaki E10SNP24 ve E10SNP158, 12. ekzonundaki E12SNP, 21. ekzonundaki E21SNP ve 33. ekzonundaki E33SNP bölgelerinde görülen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPs) bu gruplardaki dağılımlarının araştırılması ve bu bölgelerin OTH ile ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bununla birlikte, GH olan ve tiroid hastalıkları görülmeyen sağlıklı bireylerde, çalışmamız kapsamındaki TG gen polimorfizmleri ile HLA-DR3 birlikteliği değerlendirilerek, GH'nda, yaygın TG varyantları ile HLA-DR3 ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, toplumumuzdaki TG gen polimorfizmlerinin sıklığı ve OTH ile ilişkisinin ortaya konması, GH'nda TG gen polimorfizmleri ile HLA-DR3 birlikteliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 1.1. OTH'na Giriş

Tiroid fonksiyonlarında gelişen endokrin düzensizlikler, tiroid bezinin normalden fazla veya az çalışmasına neden olmaktadır. Bu durum, konjenital faktörlere bağlı olabildiği gibi, iyot kullanımındaki dengesizlik, gebelik, radyoterapi, cerrahi girişim, viral infeksiyonlar ve infiltratif düzensizlikler nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir. Etken faktörlerin çeşitliliğine bağlı olarak, farklı klinik alt gruplara sahip tiroid hastalıklarının önemli bir bölümünden ise, patogenezi tam olarak anlaşılammış olsa da otoimmün mekanizmaların sorumlu olduğu görülmektedir (Koloğlu, 1996; Karnath and Hussain 2006; McGrogan, 2008).

OTH, yaygın bir organ spesifik otoimmün hastalık grubudur. Bu hastalıkların genel populasyonda görülme sıklığının %5 olduğu ve kadınlarda daha yaygın görüldüğü belirtilmektedir. Otoimmüniteye bağlı olarak gelişen bu hastalıklarda, tiroid bezinin hipofonksiyonu veya hiperfonksiyonu görülebilmekte; bazı durumlarda, aynı hastada farklı dönemlerde her iki klinik tablo gözlemlenebilmektedir (Caturegli, 2007).

Klinik ekspresyonuna göre, OTH genel olarak 2 gruba ayrılır. Bunlar otoimmün tirotoksikoz olarak ta ifade edilen GH ve kronik otoimmün tiroidit (KOT), ya da diğer adıyla HT hastalıklarıdır. Bunun dışında, genel olarak HT varyantları olarak adı geçen idiopatik miksödem (atrofik tiroidit), sessiz tiroidit (ağrısız tiroidit) ve postpartum tiroiditin, OTH grubuna dahil edilen diğer hastalıklar olduğu görülmektedir (Efe, 1996; Weetman, 2004; Caturegli, 2007; Klecha, 2008).

## 1.2. OTH'nda Patogenez

Tiroid otoimmüncesinin klinik ekspresyonu, büyük ölçüde immün yanıt paternlerine bağıdır. Genel bir ifade ile OTH, tiroid antijenlerinin neden olduğu T hücre infiltrasyonu ve otoantikör üretimi neticesinde gelişmektedir. HT'nde baskın gelen immünolojik mekanizma, T hücrelerinin sitokin sentezi sonucu oluşan tiroid hücre hasarı ve apoptotik hücre ölümdür. GH'nda ise TSHR otoantikörlerinin neden olduğu tiroid hücre stimülasyonu görülmektedir. Her iki hastalığın da, tiroid antijenlerine karşı birbiri ardına gelişen hücrenel ve humoral immün yanıt sonucu oluştuğu bilinmekte; genetik yatkınlığı olan bireylerde ise, büyük bir olasılıkla çevresel uyarıların etkisi ile geliştiği belirtilmektedir (Weetman, 2004; Brown, 2009).

Tiroid otoimmüncesi görülen hastalar ile hayvan modellerinde çeşitli tirosit, monosit, makrofaj, dentritik hücre ve T hücre anomalilerinin görüldüğu bilinmektedir. Anormal yapıdaki tirositler ile antijen sunan hücreler ve T hücre formlarının uygun olmayan interaksyonu sonucu, tiroid antijenlerini hedef alan atipik otoimmün reaksiyonların geliştiği belirtilmektedir (Canning, 2003).

Genetik yatkınlığı olan bireylerde, çevresel ve hormonal faktörlerin etkisiyle oluşan tiroit otoimmün disfonksiyonunun, Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki dengenin bozulmasından ileri geldiği düşünölmektedir. Patolojik açıdan, bu dengenin herhangi bir yönüne doğru gelişen sapmanın, tiroid parankimasının lenfositik infiltrasyonu ile karakterize olduğu belirtilmektedir. Ancak, Th1 ile ilişkili hücrenel immün yanıtın baskın olduğu durumlarda, tirositlerin yıkımı ve bunun sonucunda hipotiroidizmin geliştiği; Th2 hücrelerinin baskın olduğu humoral immün yanıtta ise, TSHR'ne karşı gelişen uyarıcı otoantikörlerin hipertiroidizme neden olduğu ifade edilmektedir. Th2 yönünde, TSHR'ni bloke eden otoantikörler geliştiği zaman, hipotiroidizmin görüldüğu idiopatik miksödem hastalığının oluşabildiği belirtilmektedir (Klecha, 2008; Brown, 2009).

HT, T hücre ilişkili otoimmüitenin tipik bir örneği olarak kabul edilmektedir. Bu hastalıkta Th1 hücrelerinin baskın olması neticesinde, tiroid bezindeki tersiyer lenfoid foliküllerin ektopik formasyonu ve tiroid foliküllerinin yıkımı görölmektedir. HT hastalarının tiroid dokusundan alınan örnekler incelendiğinde, tiroid foliküler hücre nükleuslarının mononükleer hücre infiltrasyonu ile kuşatıldığı, apoptozise işaret eden DNA fragmentasyonu ve hücre immüniteye bağlı hücre yıkımının göröldüğü belirtilmektedir. HT hastalarında, difüz ve mikronodüler guatrın görölebildiği; ayrıca, bu hastaların serum örneklerinde anti TPO ve/veya anti TG antikorlarının saptandığı bilinmektedir. İntratiroidal immün hücrelerin T ve B lenfositleri olduğu; ancak daha sonra, CD4 (+) Th1 hücrelerinin baskın hale geldiği ifade edilmektedir (Orgiazzi, 2000; Phenekos, 2004; Klecha, 2008).

GH'nda ise, TSHR'ne özgü otoantikor üretimine yol açan, daha hafif bir infiltrasyon görölmektedir. Bu antikorlar, tiroid foliküler hücrelerinin büyüme ve fonksiyonunu uyarmakta ve bunun sonucunda hipertiroidizmin gelişmektedir. Diğer antikor ilişkili otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, gebelik sürecinde bu antikorların anneden fetusa geçebildiği; bu durumda, tiroid dokusunda görölen infiltrasyonun, büyük ölçüde T lenfositlerini içerdiği; Th1 hücrelerinin bulunmasına karşın, CD4 (+) Th2 hücrelerinin ağırlıkta olduğu ifade edilmektedir (Orgiazzi, 2000; Phenekos, 2004).

OTH patogeneğinde, diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi; hem genetik özelliklerin, hem de çevresel uyarıların etkisini gerektiren multifaktöriyel etiyoloji görölmektedir. OTH etiyopatogenezi ile ilişkili olarak, son yıllarda kabul gören ortak düşünce, OTH'nın poligenik bir hastalık olduğu; tiroid bezine karşı gelişen hem hücrenel, hem de humoral immün yanıtın duyarlılık genleri ile çevresel uyarıların karşılıklı etkileşiminin bir sonucu olduğudur (Tomer, 2003).

### 1.3. OTH'nda Genetik Faktörler

OTH patogenezinde, genetik faktörlerin önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, ikiz çalışmalarından elde edilen veriler ışığında, özellikle GH gelişiminde genetik etkenlerden ileri gelen riskin %79'a kadar ulaştığı bildirilmektedir. Farklı bağlantı analiz yöntemleri kullanılarak yapılan tüm genom tarama çalışmaları neticesinde, OTH kalıtımı ile 14 farklı kromozoma dağılmış markırlar arasındaki bağlantıyı gösteren kanıtlara ulaşılabildiği belirtilmektedir. OTH genetiği hakkında, bugüne kadar çok sayıda çalışmanın gerçekleştirildiği ve genetik yatkınlık üzerinde önemle durulduğu görülmektedir. Bu hastalıklarla bağlantılı ve/veya ilişkili birkaç gen belirlenmiştir. Ayrıca, OTH'ın kompleks ve heterojen oluşunu destekleyen aday genler ve kromozom bölgelerinin sayısının da giderek arttığı belirtilmektedir. Ancak, bu genlerin hiçbiri, hastalığın önceden tahmini veya tedavisi amacıyla kullanılmamaktadır (Ayadi, 2004; Hadj-Kajem, 2009).

OTH'nın genetik temeli, GH ve HT'nde yaygın görülen ortak genler veya bu hastalıkların birine spesifik genlerin belirlenmesi ile açıklanabilmiştir. Ortak genlerin, her iki hastalıkta da görülen, tiroid antijenlerini hedef alan lenfosit infiltrasyonu ve tiroid spesifik otoantikor üretimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna karşın, sadece GH veya sadece HT'ne spesifik genlerin farklı mekanizmalarla ilişkili olduğunun düşünülmektedir. Çünkü GH'nda hipertiroidizm nedeni, TSHR'ne karşı gelişen uyarıcı otoantikorlardır. HT ise, glanduler yıkım ve sonuçta hipotiroidizme neden olan tiroisit apoptozisi ile karakterizedir. OTH ile ilişkili bulunan genler, immün sistemle ilişkili genler ve tiroid spesifik genler genel olarak 2 grupta incelenmektedir (Ban and Tomer Y, 2005; Jacobson and Tomer, 2007).

### 1.3.1. İmmün Sistemle İlişkili Genler

HLA Genleri:

Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC), HLA glikoproteinlerinin de içinde bulunduğu bir grup geni kodlayan, 6. kromozomun 6p21 bölgesinde yerleşim göstermektedir ve bu bölgenin 3 500 kb uzunluğunda geniş bir bölge olduğu bilinmektedir. HLA grubu dışında, ısı şok proteinleri (HSP-70), lenfotoksin ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) sitokinlerini kodlayan genler MHC bölgesinde yer almaktadır. (Nelson and Hansen,1990; Ruuls, and Sedgwick, 1999; Davla ve Beksaç, 1999).

MHC bölgesinde yer alan genlerin, normal immün yanıt fonksiyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. HLA grubunda yer alan antijenlerinin temel görevi, endojen ve ekzojen kaynaklı peptitlerin immün sisteme tanıtılmasıdır. Bu peptit yapıların mikroorganizmalara ait antijenler, transplantasyonla vücuda giren veya tümör dokularında bulunan antijenik yapılar ve immün yanıtı uyaran otoantijenler olduğu bilinmektedir. HLA, fagositoz yapabilen ve/veya antijen sunma özelliğine sahip hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır ve işlenmiş bir antijenin T lenfositlerine sunulmasında görevlidir. T lenfositleri de, yüzeylerindeki HLA yapıları sayesinde, işlenmiş antijenleri tanıyabilmektedir. HLA lokusu oldukça polimorfik bir bölgedir ve HLA lokusunun bireyler arasındaki özdeşlik olasılığı çok düşüktür. Bu sebeple transplantasyonda, verici hücrelerinin alıcı immün sistemi tarafından self (kendine ait) veya nonself (kendine yabancı) olarak tanımlanmasında, bunun bir sonucu olarak ise rejeksiyonda, HLA lokusunun temel belirleyici olduğu bilinmektedir. Bazı HLA yapıları sadece kan hücrelerinde değil, organizmanın diğer doku hücrelerinde de bulunmakta ve HLA'nın tanımlanması amacıyla kullanılan yöntemler HLA Tiplendirmesi veya Doku Tiplendirmesi olarak adlandırılmaktadır (Davla ve Beksaç, 1999; İmir T, 1999; Shankarkumar, 2004).

Antijenik yapı, üretim ve fonksiyonlarına göre HLA'nın 2 gruba ayrıldığı görülmektedir: Sınıf I ve Sınıf II. Ancak HLA lokusunda, bu iki bölge dışında komplement, hormon, intraselüler peptit prosesi ve diğer gelişimsel özelliklerden sorumlu bir bölgenin bulunduğu bilinmekte ve bu bölge, Sınıf III bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Sınıf III bölgesinin, HLA kompleksinin bir parçası olarak kabul edilmese de, komponentlerinin ya HLA fonksiyonları ile ilişkili olması, ya da kontrol mekanizmasının HLA genleriyle benzer olması nedeniyle, HLA lokusu içinde yer aldığı kabul edilmektedir (Shankarkumar, 2004).

Hücre yüzeyinde sergilenen glikopeptit antijenlerin HLA-A, HLA-B ve HLA-C serisi Sınıf I olarak adlandırılmaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış Sınıf I antijenlerinin, daha çok nükleuslu hücrelerin yüzeyinde sergilendiği bilinmekte; ayrıca plazmada solübl formda bulunduğu ve plateletlerin yüzeyine bağlanabildiği belirtilmektedir. Eritrositlerin de Sınıf I antijenlerini farklı spesifitede adsorbe edebilme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, eritrosit yüzeyinde bulunan Bg antijenlerinin HLA-B7, HLA-A28 ve HLA-B57'yi tanıyabildiği ifade edilmektedir. İmmunolojik çalışmaların, en polimorfik bölge olan HLA-B bölgesinin, en anlamlı bölge olduğuna dikkat çektiği; bunu sırasıyla, HLA-A ve HLA-C'nin takip ettiğine işaret ettiği görülmektedir. Diğer HLA Sınıf I lokusları olan HLA-E, F, G, H, J, K ve L'nin peptit antijen sunumunda önemli olmadığı belirtilmektedir. HLA Sınıf I antijenleri 45 kDA'luk 3 domaine sahip bir glikopeptid ağır zincirinden oluşmakta; bu yapılar  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 ve  $\alpha$ -3 olarak adlandırılmakta ve nonkovalent bağlarla MHC kompleksi tarafından kodlanmayan  $\beta$ -2 mikroglobulin molekülüne bağlanmaktadır.  $\beta$ -2 mikroglobulinin, ağır zincir molekülüne yapısal destek görevi gördüğü belirtilmektedir. Burada, hücre membranının lipit bilayer (çift tabakalı lipid) kısmına bağlanan Sınıf I antijeninin, kısa bir sitoplazmik kuyruk içerdiği kabul edilmektedir. HLA Sınıf I molekülünün asıl görevi, virüsle infekte hücrelerde işlenmiş viral peptit antijenleri sitotoksik T lenfosit (CD8 (+) T lenfositleri) reseptörlerine sunmaktır. Virüsle infekte hücrelerde, viral proteinler parçalanıp daha küçük peptit yapılara ayrılmakta; bu sırada Sınıf I antijenleri sentezlenmektedir. Antijen sunumu gerçekleşirken, sitotoksik T lenfositlerinin de yüzeyinde aynı viral protein ve HLA bulunmaktadır. HLA Sınıf I antijenlerinin

tümör oluşumu ile ilişkisi de bilinmektedir. Sınıf I antijen defektlerinin, malign hücrelerde sık görüldüğü; bu defektlerin, tümör hücrelerinin sitotoksik T lenfositleri tarafından tanınıp yok edilmesine engel olduğu belirtilmektedir. HLA Sınıf I antijenlerinin ekspresyonu ve/veya fonksiyonunda görülen anomaliler, sadece tümör antijenlerinin sitotoksik T lenfositlerine sunumunu etkilememekte; ayrıca, tümör hücrelerinin NK hücrelerine karşı gösterdiği dirençte de rol almaktadır. HLA Sınıf I antijenleri organizmanın tüm hücrelerinde sentezlenmektedir (Shankarkumar, 2004; Chang, 2004).

Hücre yüzeyindeki glikopeptit antijenleri kodlayan DP, DQ ve DR lokusları HLA Sınıf II grubunda incelenmekte ve bu antijenler lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler ve T lenfositlerinin içinde bulunduğu immün sistem hücrelerinin yüzeyinde sergilenmektedir. Bu hücrelerin, normal koşullarda Sınıf II antijenlerini sergilemedikleri; interferon gibi bir sitokin uyarımında ve transplantasyon sonrası akut graft restriksiyonunda eksprese oldukları bilinmektedir. HLA Sınıf II molekülü, HLA kompleksi içinde yer alan genler tarafından kodlanan 2 zincirden oluşur:  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri. Bu zincirlerin peptit bağlayan kısımları  $\alpha$ -1 ve  $\beta$ -1 olarak adlandırılırken; immunglobulin benzeri bölge  $\alpha$ -2 ve  $\beta$ -2 olarak tanımlanmaktadır. Sınıf II moleküllerinin ilişkili oldukları hücreler yardımcı T lenfositleri (CD 4 (+) T hücreleri) olup; bu hücreler genellikle bakteriyel invazyona karşı gelişen sitokin yanıtında, ya da hücrel veya humoral defansta rol almaktadır. HLA Sınıf II'nin bu görevinin, sadece immünolojik olarak aktif hücrelerde sergilenip, tüm doku hücrelerinde bulunmamasının nedeni olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca, belirli HLA Sınıf II allellerini taşıyan bireylerde, otoimmün hastalıkların gelişme riskinin de attığı bilinmektedir (Nishimura, 2001; Shankarkumar, 2004).



**Tablo 1.1.** Tanımlanmış HLA Sınıf I ve Sınıf II Genlerinin Rutin Olarak Tiplendirilme Durumları (Shankarkumar, 2004).

Grup	HLA Lokusu	Rutin olarak Tiplendirilme
Sınıf I	A	<b>var</b>
Sınıf I	B	<b>var</b>
Sınıf I	C	<b>var</b>
Sınıf I	E	yok
Sınıf I	F	yok
Sınıf I	G	yok
Sınıf I	H	yok
Sınıf I	J	yok
Sınıf I	K	yok
Sınıf I	L	yok
Sınıf II	DRA	yok
Sınıf II	DRB1	<b>var</b>
Sınıf II	DRB2	yok
Sınıf II	DRB3	<b>var</b>
Sınıf II	DRB4	<b>var</b>
Sınıf II	DRB5	<b>var</b>
Sınıf II	DRB6	yok
Sınıf II	DRB7	yok
Sınıf II	DRB8	yok
Sınıf II	DRB9	yok
Sınıf II	DQA1	yok
Sınıf II	DQB1	<b>var</b>
Sınıf II	DQA2	yok
Sınıf II	DQB2	yok
Sınıf II	DQB3	yok
Sınıf II	DOB	yok
Sınıf II	DMA	yok
Sınıf II	DMB	yok
Sınıf II	DNA	yok
Sınıf II	DPA1	yok
Sınıf II	DPB1	-
Sınıf II	DPA2	yok
Sınıf II	DPB2	yok

İnsanda, OTH için tanımlanan ilk duyarlılık lokusunun HLA-DR olduğu bilinmektedir. Bundan yola çıkarak, TSH reseptörlerine karşı oluşan otoantikörlerin HLA Sınıf II ilişkili olduğu belirtilmektedir. GH ile HLA ilişkisi üzerine yapılan ilk çalışmalarda, Sınıf I grubunda yer alan HLA-B8'in 1,5-3,5 rölatif riskle GH ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunu takip eden çalışmalarda ise, HLA-DR3'ün GH ile

ilişkisinin daha güçlü olduğu belirlenmiş ve HLA-DR3'ün HLA-B8 ile bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) gösterdiği bulunmuştur. Beyaz ırkta, HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) ve DQA1\*0501 haplotiplerinin sıklığının GH'nda arttığı; DR3 allelini taşıyan bireylerde ise, rölatif riskin yaklaşık 2-4 olduğu ifade edilmiştir (Farid, 1980; Farid, 1981; Mangklabruks, 1991; Yanagawa, 1993; Heward, 1998; Tomer, 1999; Jacobson, 2008). GH tanısı olan bireylerde ve kontrollerde HLA-DRB1 lokusunun dizi analizi sonucunda, HLA-DR $\beta$ 1 zincirinin 74. pozisyonundaki arjinin (DR $\beta$ -Arg-74) sıklığına dikkat çekilmiş olup; GH grubunda, kontrollere kıyasla bu sıklık artışının gösterilmiş olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, HLA-DR3 allelini taşımayan hastalarda, kontrollere karşılaştırıldığında, DR $\beta$ -Arg-74 sıklığının daha fazla olduğu belirlenmiş; GH ile DR $\beta$ -Arg-74 ilişkisinin HLA-DR3 ilişkisinden bağımsız olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Ban, 2004a; Jacobson and Tomer, 2007).

HLA haplotipleri ile HT ilişkisine dair ortaya konmuş verilerin GH kadar kesinlik içermediği ifade edilmektedir. HT'nin basit bir otoantikor yanıtından, guatr veya tiroid fonksiyonlarının tamamen bozulması ile karakterize atrofik tiroidite kadar giden ve çeşitli klinik bulguları içine alan geniş bir hastalık grubu olması, bu sorunun altında yatan bir neden olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda beyaz ırkta, HT ile ilişkili HLA allellerinin HLA-DR3, HLA-DR4 ve DR5 olduğu belirtilmiş; daha sonraki çalışmalarda beyaz ırkta, HLA-DQw7 (DQB1\*0301)'in HT ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Farid, 1981; Badenhoop, 1990; Jenkins, 1992; Davies and Amino, 1993).

#### CTLA-4 Geni:

CTLA-4, T lenfositleri ile antijen sunan hücreler (APC) arasındaki etkileşime katkı sağlayan, önemli bir kostimulatuar moleküldür. Bu molekülü kodlayan CTLA-4 geni, uyarıcı kostimulatör protein (ICOS) ve CD28 genleriyle bir gen kümesi oluşturacak şekilde, kromozom 2q33'te yerleşim gösteren, 300 kb uzunluğunda bir bölgede bulunmaktadır (Ban and Tomer, 2005).

İmmün yanıtta T lenfositlerinin aktive olabilmesi için, APC'in yüzeyindeki HLA Sınıf II ile bağlı antijenik bir peptidi T hücre reseptörlerine (TCR) tanıtması gerekmektedir. Ancak, T hücre aktivasyonu için ikinci bir adımın daha gerekli olduğu; bu adımın, APC'den veya diğer lokal hücrelerden alınacak kostimulatuar bir sinyal olduğu bilinmektedir. Bu sinyal, APC yüzeyindeki B7-1, B7-2, B7h ve CD40 gibi proteinlerin, CD4 (+) T hücre yüzeyindeki CTLA-4, CD28 ve CD40L gibi reseptörlerle etkileşime geçmesi sonucu oluşmaktadır. CD28'in B7'ye bağlanması sonucu, T hücrelerinin aktivasyonu artmakta; buna karşın B7'ye, CD28 ile rekabet halinde, ancak daha güçlü bir afiniteyle bağlanan CTLA-4 molekülü, bir atenuatör görevi görerek aktivasyonu azaltmaktadır. Bu iki molekülle aynı bölgeden kodlanan bir kostimulatör olan ICOS proteini ise, CD28 gibi upregülasyonda görevlidir. Ancak, farklı olarak IL-2 yerine IL-4 üretimini uyarmaktadır. Aynı kromozom bölgesinde kodlanan CTLA-4, CD28 ve ICOS'un otoimmün hastalıklar ile ilişkisinde, her bir genin ayrı ayrı etkili, veya bağlantı dengesizliği nedeniyle kombine olarak etkili olabilecekleri belirtilmektedir. OTH dikkate alındığında ise, en güçlü ilişkinin CTLA-4 ile bulunduğu bilinmektedir (Coyle, 2000; Ban and Tomer 2005).

CTLA-4, 3 ekzondan oluşan oldukça polimorfik bir gen bölgesidir ve bu bölgede otoimmünite ile ilişkili birkaç polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan en dikkat çekeninin, 1. ekzonun 49. pozisyonda bulunan ve sinyal peptid molekülünde Ala/Thr değişimine neden olan A/G SNP olduğu belirtilmektedir. Diğerlerinin ise, 3'UTR bölgesindeki (3' ucunda çevirisi yapılmayan bölge) AT dinükleotid tekrarı (mikrosatellit) ve yine 3'UTR yönünde, C60 olarak adlandırılan bir SNP olduğu ifade edilmektedir (Ban and Tomer 2005; Jacobson and Tomer 2007; Şahin ve ark. 2008).

Tüm genom tarama çalışmaları sonucunda, CTLA-4 ile OTH tanısında önemli bir klinik gösterge olan tiroid otoantikörleri arasında, maksimum bir LOD skor değeri belirlenerek güçlü bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca, A/G49 SNP bölgesindeki G alleli, yüksek düzeyde anti-TG ve anti-TPO otoantikörleri ile ilişkili bulunmuştur. GH ile CTLA-4 ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, 3'UTR

mikrosatellit (rölatif risk 2,1-2,8) ve A/G SNP değişiminde G allelinin ( rölatif risk yaklaşık 2,0) GH ile ilişkili bulunduğu; farklı populasyonlarda bu ilişki üzerine yapılan çalışmaların birbiriyle uyumlu olduğu görölmektedir (Yanagawa, 1995; Yanagawa, 1997; Akamizu, 2000; Park, 2000; Jacobson and Tomer 2007). C60 SNP bölgesinin de, GH ile güçlü bir ilişkisinin olduğu belirlenmiştir. CTLA-4'ün, beyaz ırk ve Japonlar'ı içine alan farklı populasyonlarda HT ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, GH ve HT gelişiminde CTLA-4 polimorfizmlerinin sadece yatkınlık oluşturduğu; çevresel faktörlerin etkisinin de dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır (Jacobson and Tomer 2007).

#### CD40 Geni:

TNF reseptör ailesinin bir üyesi olarak adı geçen CD40 geni, kromozom 20q13.1'de yerleşim göstermektedir. Bu bölgeden kodlanan CD40 molekülü, çoğunlukla B hücrelerinde sergilenen, aynı zamanda monositler, dendritik hücreler, epitelyal hücreler ve diğer bazı hücrelerde de bulunan 45-50 kDa'luk bir transmembran glikoproteinidir. CD40'a spesifik ligandlar, genellikle aktive olmuş T hücrelerinde sergilenen, CD40L ve CD154 molekülleridir. CD40'ın ligandları ile etkileşime geçmesi sonucu, T hücrelerine bağlı B hücreli immün yanıt oluşumunun gerçekleştiği bilinmektedir. Bunun sonucunda germinal hücre formasyonu, immünglobulin izotip dönüşümü ve B hafıza hücrelerinin jenerasyonu gerçekleşmektedir. Kısa bir ifadeyle, CD40 molekülü humoral immün yanıtın regülasyonu, santral ve periferel T hücre toleransı ve APC fonksiyonunda önemli bir role sahiptir (Ban and Tomer, 2005; Jacobson and Tomer 2007; Peters, 2008).

Tüm genom tarama yöntemi kullanılarak, CD40 geninde GH için bir duyarlılık bölgesi tanımlanmış ve GH ile ilişkili bu bölgenin HT ile herhangi bir bağlantısının olmadığı belirlenmiştir. CD40 geninin tamamının dizi analizi yapılarak, Kozak sekansı adı verilen bölgede yerleşim gösteren bir C/T polimorfizmi tanımlanmıştır. Kozak sekansının vertebra genlerinde, AUG başlangıç kodonunun yakınında bulunan ve translasyonun başlaması için gerekli olan bir nükleotid dizisi

olduğu bilinmektedir. CD40 geninde tanımlanan C/T polimorfizmine ilişkin yapılan hasta-kontrol alışmaları, CC genotipinin GH ile ilişkili olduğuna dikkat çekmekte; daha sonra beyaz ırk, Koreliler ve Japonlar'ı içine alan farklı popülasyon verileri ile bu ilişkinin desteklenmiş olduğu ifade edilmektedir (Ban and Tomer, 2005; Peters, 2008).

#### PTPN-22 Geni:

Lenfoid Tirozin Fosfataz (LYP) enziminin, CTLA-4 gibi T hücrelerinin aktivasyonu için güçlü bir inhibitör görevi gören, 110 kDa'luk bir molekül olduğu ve 1. kromozomun 1p13'de yer alan PTPN-22 geni tarafından kodlandığı bilinmektedir. PTPN-22 geni 620. kodonunda tanımlanmış, triptofan/arjinin değişimine neden olan mutasyonun (R620W) diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, GH ve HT hastalığında görüldüğu bildirilmiştir. CTLA-4 geninden farklı olarak, PTPN-22'nin etnik gruplar arasında farklılık gösterdiği ve bunun nedeninin, bazı varyantların belirli etnik gruplarda görülmemesi olabileceği belirtilmektedir. Örneğin PTPN-22'nin triptofan varyantının Japon popülasyonunda nadir görüldüğu belirlenmiş ve PTPN-22'nin Japonlar'da otoimmüniteyle ilişkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Bottini, 2004; Smyth, 2004; Tomer and Huber, 2009).

PTPN-22 geninin triptofan varyantının, LYP enzimini T hücreleri üzerinde daha güçlü bir inhibitör etkiye sahip hale getirdiği belirtilmekte; bu duruma olası bir açıklama olarak ta, azalan TCR sinyalinin self reaktif T hücrelerinin timik delesyondan kurtulup perifere kaçmasına olanak verebileceği ifade edilmektedir (Jacobson and Tomer 2007; Tomer and Huber, 2009).

#### İmmün Sistemle İlişkili Diğer Genler:

IgG molekülünün ağır zincirini kodlayan IgH geninin, Japonlar'da GH ile ilişkili bulunduğu; ancak, beyaz ırkta yapılan çalışmalarda bu ilişkinin belirlenemediği görülmektedir. IgH genin Japon popülasyonunda GH ile ilişkili

bulunmasının founder etkiden kaynaklanmış olabileceği veya küçük populasyon örnekleminin rastgele bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda, immün modülatör fonksiyonlara sahip olan TNF- $\alpha$  ve vitamin D reseptör genlerinin, Japonlar'da GH ile ilişkili bulunduğu görülmektedir. Ayrıca, protein tirozin fosfataz ailesinin bir üyesi olan PTPN12 genindeki 7 SNP bölgesinin GH ile ilişkili olmadığı; ancak, bunlardan 4 tanesinin TSHR genindeki bir SNP ile etkileşim halinde olduğu; bu sebeple GH patogenezinde rolünün olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, bir çok otoimmün hastalık için bir duyarlılık geni olduğuna işaret edilen FCRL-3 (Fc receptor-like-3) genin de GH ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Ban and Tomer, 2005; Tomer and Huber, 2009; Gu, 2010).

Bu genelerin dışında kalan; IL-1 reseptör antagonisti, interferon- $\gamma$ , IL-4 ve transporter ilişkili antijen sunumu genlerinin de GH2nda araştırılan genler olduğu; ancak bu araştırmalardan birbirini destekleyen sonuçlar alınmadığı ifade edilmektedir (Ban and Tomer, 2005).

### **1.3.2. Tiroid Spesifik Genler:**

#### **TG Geni:**

Tiroid bezi, tiroid hormonlarının, özellikle de tiroksinin (T4) sentezinden sorumludur ve foliküler bir yapıya sahiptir. Tiroid bezindeki epitelyal hücrelerin, apikal membranın bulunduğu yerde bir lümen ile, ve bazal membran yüzeyi boyunca dolaşım sistemine bağlandığı belirtilmektedir. Tg, tiroid bezinin en fazla eksprese olan proteini olarak bilinmektedir ve tiroisitler tarafından foliküler lümenine salındığı kabul edilmektedir. Tiroid hormonları için hem bir prekürsör, hem de depo görevi gören Tg molekülünün, OTH'nda önemli bir hedef molekül olduğu; bunun bir göstergesi olarak ise GH ve HT hastalıklarında Tg proteinine karşı gelişen otoantikörlerin (Anti-Tg), hastaların tamamına yakın bir kısmında görülebildiği ifade edilmektedir (Graaf, 2001; Tomer and Davies, 2003; Tomer and Huber, 2009).

İnsan TG geninin, 8. kromozomda (8q24.2-8q24.3) yerleşim gösteren, 270 kb uzunluğunda bir bölge olduğu bilinmektedir. Bu genin kodlanan kısmı, 48 ekzona bölünmüş, 8,5 kb uzunluğunda bir bölgeden oluşmaktadır. Ayrıca, 64 kb uzunluğundaki 41. intron bölgesinde, Src-like adaptör proteinini (hSLAP) kodlayan ve transkripsiyonunun TG geninin tersi yönünde gerçekleştiği düşünülen bir genin yer aldığı belirtilmektedir (Meijerink, 1998; Rivolta and Targovnik 2006).

TG geninin ekspresyonunun TSH hormonu tarafından, intraselüler cAMP düzeyine bağlı olarak ve hücrenin bazal membranında yer alan TSHR aracılığıyla kontrol edildiği ifade edilmektedir. Transkripsiyonunun ise, tiroid spesifik transkripsiyon faktör-1 (TTF-1), TTF-2 ve PAX-8 genleri tarafından düzenlendiği belirtilmektedir. İnsanda, TG geni mRNA uzunluğunun 8 449-8 468 bç olduğu; ayrıca burada 41 nükleotid uzunluğunda 5' UTR, bunu takip eden 8307 bazlık bir open reading frame ve 101-120 bç uzunluğunda 3' UTR bölgelerinin yer aldığı ifade edilmektedir. Burada mRNA'nın 21 nükleotid polimorfizmi, splicing sonrası oluşan 11 farklı transkript ve 4 farklı poliadenilasyon kesim bölgesi varyantı nedeniyle oldukça heterojen bir yapıya sahip olduğu belirtilmektedir (Graaf, 2001; Rivolta and Targovnik, 2006).

Bugüne kadar, insan TG geninde, 14'ü amino asit değişikliğiyle sonuçlanan 21 farklı SNP bölgesi tanımlanmıştır. Ancak, bu polimorfizmlerin Tg proteinindeki fonksiyonel etkilerinin bilinmediği vurgulanmaktadır. TG geninde ayrıca, inaktivasyona neden olan 20 yanlış anlamlı, 8 splice bölgesi, 5 anlamsız ve 2 tek nükleotidlik delesyon olmak üzere 35 mutasyon tanımlanmıştır (Rivolta and Targovnik, 2006).

**Tablo 1.2.** İnsanda TG Geni Polimorfizmleri. (Rivolta and Targovnik, 2006)

Ekzon	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asit Pozisyonu
3	c.229G>A	p.G58S
4	c.426C>T	p.D123D
10	c.2200T>G	p.S715A
10	c.2330C>T	p.P758L
10	c.2334T>C	p.P759P
10	c.2443G>A	p.G796R
10	c.2488C>G	p.Q811E
11	c.2963G>C	p.R969P
12	c.3082A>G	p.1009V
16	c.3474T>C	p.S1139S
18	c.3906G>A	p.P1283P
18	c.3935G>A	p.G1293D
21	c.4493C>T	p.T1479M
21	c.4506C>T	p.A1483A
29	c.5512A>G	p.N1819D
33	c.5995C>T	p.R1980W
38	c.6695C>T	p.P2213L
43	c.7408C>T	p.L2451L
43	c.7501T>C	p.W2482R
44	c.7589G>A	p.R2511Q
46	c.7920C>T	p.Y2621Y

Konjenital hipertiroidizm veya OTH görülen ailelerde TG geninde, bağlantı analiz çalışmaları için kullanılacak, informatif moleküler markırların tanımlanmış olduğu belirtilmekte; bunlar arasında, bahsedilen 21 SNP bölgesinin yer aldığı ifade edilmektedir. Ayrıca, 18. intronda yer alan 1 464 bp uzunluğundaki bölgede, geniş bir insersiyon/delesyon (Indel) polimorfizmi bulunduğu işaret edilmektedir. Kısa tekrar bölgelerinin (STRs), bağlantı analizleri için kullanışlı moleküler markır olabildiği dikkate alınarak; 10. intron (Tgms 1), 27. intron (Tgms 2), 29. intron (TGrI29) ve 30. intron (TGrI30) bölgelerinde yer alan 4 farklı STRs tanımlanmıştır. Bu informatif polimorfik markırların, gelecekte herhangi bir mutasyonun belirlenmediği olgularda, veya etkilenmiş bir yenidoğan ya da TG mutasyonlarının görüldüğü ailelerdeki gen taşıyıcılarının hızlı identifikasyonuna, ve genetik bağlantı analizi ile indirekt hastalık identifikasyonuna olanak sağlayacağı ifade edilmektedir (Rivolta and Targovnik, 2006).



OTH'na ilişkin olarak, birkaç farklı yakınlık lokusu tanımlanmıştır. Bunlar arasında, 8q24'te lokalize TG geni, en önemli lokus olarak kabul edilmiştir. OTH ile 27. intron bölgesinde yer alan Tgms 2 mikrosatellit markırı arasında anlamlı bir ilişkinin saptanmış olduğu; bundan yola çıkarak, TG geninin OTH için bir duyarlılık geni olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tomer and Greenber, 2004). Indel polimorfizmi ile OTH arasında anlamlı bir ilişkinin bulunamadığı belirtilmektedir. Ayrıca beyaz ırkta TG geni SNP bölgelerine ilişkin yapılan çalışmalarda, 10. ekzon ile 12. ekzon arasındaki SNP kümesi ve E33SNP ile OTH arasında anlamlı bir ilişkinin belirlenmiş olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, E33SNP CC genotipi ile HLA-DR3 interaksyonda, GH 'nda gözlemlenen risk artışına işaret edilmektedir. (Ban, 2003). Bundan yola çıkarak, Tg protein yapısında meydana gelen değişikliklerin, protein antijenitesini veya proteinin HLA molekülleri ile interaksyonunu değiştirerek, OTH'nda yakınlığa neden olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Ancak beyaz ırkta; 10. ekzon, 12. ekzon ve 33. ekzon ile OTH arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir (Ban, 2003; Collins, 2004).

#### TSHR Geni:

Anti TSHR otoantikörlerinin GH tanısındaki önemi bilinmektedir. Bu faktör dikkate alınarak GH'nda TSHR geni, aday gen analizi yapılarak incelenmiş ve üç yaygın SNPs tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi, TSHR'nün ekstraselüler domeynin 36. pozisyonudaki D36H polimorfizminde aspartik asitin histidine dönüşümü ve 57. pozisyonudaki P52T polimorfizminde prolinin treonine dönüşümüdür. Ekstraselüler domeyn, TSH hormonu ve TSHR otoantikörlerinin bağlandığı bölgedir. Teorik olarak bu bölgedeki amino asit dizisinin, TSHR'ndeki T hücre epitoplarnı değiştirdiği düşünülerek; özellikle ekstraselüler domeynin araştırıldığı ifade edilmektedir. İntraselüler domeynde yer alan D727E polimorfizmi, glutamik asitin aspartik asite dönüşümüdür (Tonacchera and Pinchera, 2000; Tomer and Davies, 2003; Ban and Tomer, 2005; Jacobson and Tomer, 2007).

TSHR'ün ekstraselüler domeynine ilişkin olarak yapılan çalışmalarda, kadınlarda P52T SNP bölgesinin GH ile ilişkili bulunduğunun ifade edildiği; ancak, daha sonra yapılan çalışmaların bu bulguyu doğrulamadığı belirtilmektedir. D36H SNP için yapılan çalışmalarda, D36H ve GH arasında anlamlı bir ilişkinin belirlenemediği belirtilmektedir. Rusya beyaz ırk popülasyonunda, D727E ile GH arasında anlamlı bir ilişkinin saptandığı (Chistiakov, 2002); ancak bunu izleyen çalışmaların bu veriyi desteklemediği ifade edilmektedir (Ban, 2002). Bu sebeple, TSHR geninin GH için bir minör duyarlılık geni olduğu belirtilmektedir (Ban and Tomer, 2005).

#### TPO Geni:

Anti TPO otoantikörlerinin, HT için spesifik bir markır olduğu bilinmekte; bu sebeple TPO geninin, OTH için bir duyarlılık geni olarak kabul edildiği ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, TPO molekülünün immünodominant epitoplarnı tanıyan otoantikörlerin, ailelerde genetik geçiş gösterdiği ifade edilmektedir. Bu epitoplarn genetik geçişinin, TPO gen dizisindeki değişimler, ve/veya genin tiroid dokusundaki ekspresyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Jaume, 1999). TPO genindeki mikrosatellit markırlar dikkate alınarak yapılan bağlantı ve asosiasyon analizleri ile, bu genin OTH ile ilişkisinin araştırılmış olduğu; bunun sonucunda, TPO geni ile OTH arasında herhangi bir bağlantı ve/veya ilişkinin belirlenemediği ifade edilmektedir (Pirro, 1995). Sonuç olarak TPO geninin, OTH için majör bir duyarlılık geni olmadığı ifade edilirken; minör bir role sahip olmasının ihmal edilemeyeceği vurgulanmaktadır (Tomer and Davies 2003).

#### 1.4. OTH'nda Çevresel Faktörler

OTH'nın, otoimmüniteye bağlı gelişen bir hastalık grubu olması dikkate alınarak; diğer organ spesifik endokrinopatilerde (ör: Tip I IDDM) görüldüğü gibi, multifaktöriyel bir etiyojolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu hastalık grubunun

gelişiminde genetik yatkınlığın önemi bilinmektedir. Günümüze kadar, OTH ile ilişkili olduğu belirlenmiş gen sayısının sınırlılığı bilinmekte; ancak, ilişkisi belirlenememiş genlerin olduğu düşünülmektedir. OTH'ın monozigotik ikizlerdeki konkordans oranının %100 olmaması nedeniyle; genetik olmayan faktörlerin önemli bir etiyolojik role sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, otoimmün hastalık insidansının düşük olduğu bölgelerden gelen göçmenlerin yeni yaşam koşullarındaki hastalık insidans oranlarının, OTH'nda çevresel faktörlerin rolünün anlaşılmasında önemli olabileceği ifade edilmektedir (Prummel, 2004).

OTH gelişiminde iyot kullanımı, gebelik, hormonal faktörlerin etkisiyle gelişen seksüel farklılıklar, infeksiyon etkenleri, sigara kullanımı, stres ve ilaç kullanımı gibi belli başlı faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir (Prummel, 2004; Tomer and Huber 2009).

#### İyot Kullanımı:

İyot kullanımının, hipotiroidizm ve hipertiroidizm üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Hipotiroidizm oranının iyot kullanımının yeterli olduğu bölgelerde, iyot yetersizliğinin görüldüğü bölgelere oranla daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Laurberg, 1998). Buna karşın, iyot yetersizliğinin görüldüğü bölgelerde tirotoksikoz prevalansındaki artışa işaret edilmektedir (Laurberg, 2000). Farklı bir sonuç olarak ise, Graves hipertiroidizmine bağlı olarak gelişen tirotoksikoz oranının, iyot alımının fazla olduğu bölgelerde ve tiroid yetersizliği için bir markır olarak kabul edilen TPO otoantikörlerinin, iyot yetersizliği görülen bölgelerde yaygın olarak görüldüğü ifade edilmektedir (Laurberg, 1991; Pedersen, 2003).

İyot fazlalığının, hipotiroidizm ve/veya guatr nedeni olduğu; aynı zamanda, otonom olarak aktif nodül yapısının oluşmasına veya GH'nın subklinik formlarına da neden olduğu belirtilmektedir. Her iki klinik tablonun altında yatan ortak mekanizmanın, tiroid yıkımına bağlı olarak tiroid otoantijenlerinin oluşması, bunun sonucunda da otoimmünitenin gelişmesi olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple,

iyot kullanımının OTH için önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir (Weetman, 2003).

#### Gebelik:

Sessiz tiroidit hastalığı doğum sonrasında görülmekte ve bu sebeple post partum tiroidit olarak adlandırılmaktadır. Post partum sürecinin ilk aylarında GH görülebilmektedir. Bu durumun, gebelik sürecinde immün sistemin baskılanması ile, doğumu izleyen ilk aylarda T hücre aktivasyonunun artmasından ileri geldiği kabul edilmektedir (Stagnaro-Green, 1992).

#### Seksüel Farklılık:

Organ spesifik otoimmün hastalıkların, erkeklere oranla kadınlarda daha yaygın görüldüğü bilinmektedir. Nedeni tam olarak açıklanamasa da, genetik faktörlerin bu durumdan sorumlu olması gerektiği; ancak, HT'nin Turner's sendromunda (45,X) yaygın olarak görüldüğü halde, Klinefelter's sendromunda (47,XXY) yaygın olmadığı bildirilmektedir. Bu durumun ise, hormonal faktörlerin OTH gelişiminde daha etkili olma ihtimalinden ileri gelebileceği belirtilmektedir (Prummel, 2004).

#### İnfeksiyon Etkenleri:

İnfeksiyon etkenlerinin OTH'nı uyardığı bilinmektedir. Bir çalışmada, yeni tanı konmuş Graves hastalarının %36'sında bakteriyel veya viral infeksiyon öyküsünün saptandığı; aynı durumun kontrollerin sadece %10'unda görüldüğü bildirilmiştir (Altonen, 1986).

OTH patogenezinde rol alan belli başlı infeksiyon etkenlerinin *Yersinia enterocolitica*, Coxsackie B virüsü, retroviruslar ve *Helicobacter pylori* olduğu;

ancak OTH ile en güçlü ilişkinin, Hepatit C virüsü ile birlikteliğinde görüldüğü ifade edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hipotiroidizmin ve tiroid otoimmünesinin görülme sıklığının, Hepatit C hastalarında kontrolere oranla arttığı ifade edilmektedir (Antonelli, 2004; Tomer and Huber, 2009).

#### Sigara Kullanımı:

Sigara kullanımının, immün sistem üzerinde etkili olduğu bilinmekte; B ve T hücrelerinin poliklonal aktivasyonuna yol açarak, IL-2 salınımını arttırdığı ifade edilmektedir. GH'nda gözlemlenen oftalmopati ve sigara kullanımı arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmekte; ancak, nedeninin bilinmediğinin altı çizilmektedir. Buna karşın, ötroid kadınlarda TPO salınımı ile sigara kullanımı arasında negatif bir ilişki olduğu ve sigaranın, otoimmün tiroidit oluşumunda koruyucu olabileceği düşünülmektedir (Hofbauer, 1997; Prummel, 2004).

#### Stres:

Bazı otoimmün hastalıkların, sıklıkla şiddetli stresten sonra geliştiği bilinmektedir. GH, strese bağlı olarak gelişen bir otoimmün hastalık olarak tanımlanmış ve Graves hastalarının, toksik nodüler guatr hastaları ve kontrollere oranla daha stresli yaşadıkları gösterilmiştir. HT ve stres arasındaki ilişkinin belirsizliğine karşın; ötroid hastalarda stres ve TPO antikorlarının salınımı arasında güçlü bir ilişki bulunduğu ifade edilmektedir (Matos-Santos , 2001; Prummel, 2004).

#### İlaç Kullanımı:

Genetik yatkınlığa sahip bireylerde, birçok ilacın OTH gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazılarının, antiretroviral tedavide kullanılan ilaçlar olan amiodarone, IL-2 ve interferon- $\alpha$  olduğu belirtilmektedir (Prummel, 2004)

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Endokrinoloji Kliniği Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu'nun, 24.09.2008-296 tarih- numaralı toplantısında alınan 2222 numaralı karar ile; protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden etik değerlere uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

### 2.1. Araç ve Gereçler :

Kullanılan Cihazlar:

- 1) Mikrosantrifüj cihazı (Nüve, Türkiye)
- 2) Sıcak su banyosu (Nüve, Türkiye)
- 3) Masaüstü vorteks cihazı (Nüve, Türkiye)
- 4) Mikropipet takımı (Thermo Finnpipe, ABD)
- 5) Spektrofotometrik ölçüm cihazı (Nanodrop ND-1000, ABD)
- 6) Thermal Cyclers (Corbett Palm-Cyclers, Almanya)
- 7) Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- 8) Buzdolabı (Profilo, Türkiye)
- 9) Derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- 10) Elektroforez tankları (Thermo, ABD; Cleaver Scientific, İngiltere)
- 11) Elektroforez güç kaynağı (Apelex PS 503, Fransa)
- 12) UV Transilluminatör (UVP, ABD)
- 13) Fotoğraf makinası (Canon, Japonya)

Kullanılan Ticari Kit ve Kimyasallar:

- 1) DNeasy Blood & Tissue DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
- 2) HLA-DR Low. Res. PCR SSP kiti (OlerupSSP, İsveç)
- 3) 10X PCR tamponu (Fermentas, Litvanya)
- 4) 10X Hot Start PCR Tamponu (Fermentas, Litvanya)
- 5) Primer sentezleri (Metabion, Almanya)
- 6) dNTP seti (Fermentas, Litvanya)
- 7) Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)
- 8) Hot Start Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)
- 9) MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Litvanya)
- 10) Agaroz (Lonza, İsviçre)
- 11) TBE (Sigma, ABD)
- 12) Etidyum bromür (Applichem, Almanya)
- 13) Orange G jel yükleme boyası (Fermentas, Litvanya)
- 14) 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas, Litvanya)
- 15) Bpu1102I, Bpu10I, Ppu21I, MspI, TaaI restriksiyon enzimleri ve tamponları (Fermentas, Litvanya)

Çalışmamızda yer alan DNA dizi analizi yöntemi, PCR ürününün saflaştırılması ve dizi analizi işlemlerini kapsayacak şekilde, Gensutek Medikal Ltd. Şti. (Ankara) firması tarafından, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde gerçekleştirilmiştir.

## 2.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Çalışmamıza, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji Kliniği'ne başvuran, GH tanısı konmuş, 44 kadın ve 26 erkek olmak üzere toplam 70; HT tanısı almış, 67 kadın ve 3 erkek olmak üzere toplam 70 hasta dahil edilmiştir. GH grubunda yer alan hastalara ait yaş ortalaması 42,73 (yaş aralığı 17-

74) olarak belirlenirken; HT grubundaki hastalara ait yaş ortalaması ise 42,95 (yaş aralığı 18-73) olarak hesaplanmıştır. OTH grubunda incelen GH ve HT gruplarındaki 111 kadın ve 29 erkek olmak üzere toplam 140 hastaya ait yaş ortalaması 42,84 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamıza ayrıca, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye 2 Polikliniği'ne farklı nedenlerle başvuran; tiroid fonksiyonları, tirod hormon ve otoantikör değerleri dikkate alınarak, I. ve II. derece akrabalarında guatr, tiroid disfonksiyonu, tiroid karsinomu ve otoimmün tiroid hastalıkları görülmeyen 55 kadın ve 15 erkek olmak üzere toplam 70 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ait yaş ortalaması 44,34 (yaş aralığı 17-78) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen hasta ve kontrol gruplarına ait periferik kan örnekleri, EDTA'lı tüpe, her bir hasta ve kontrol için bir adet olacak şekilde, yaklaşık 3cc kadar alınmıştır. Kan örnekleri, DNA izolasyon tarihine kadar bir haftayı geçmeyecek şekilde +4 °C'de, uzun süreli beklemelerde ise -20 °C'de korunmuştur.

Çalışmamızda, GH grubunda yer alan hastalarda dikkate alınana kriterler:

- 1) Klinik ve biyokimyasal bulgulara bağlı olarak belirlenmiş, tedavi gerektiren hipertiroidizm.
- 2) Difüz guatr varlığı ve TSHR otoantikör pozitifliği.

Çalışmamıza HT grubuna dahil edilen hastalarda dikkate alınan kriterler:

- 1) Klinik ve biyokimyasal bulgulara bağlı olarak belirlenmiş, tiroid hormon tedavisi gerektiren hipotiroidizm.
- 2) Anti-TPO ve/veya anti-Tg otoantikör pozitifliği.



### **2.3. Genomik DNA İzolasyonu**

Hasta ve kontrol gruplarından toplanan periferik kan örneklerinde, total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunda, spin column yöntemi tercih edilmiş; DNA izolasyonu için, kullandığımız ticari kite ait DNeasy Blood & Tissue Handbook klavuzunda yer alan, Purification of Total DNA from Animal or Cell (Spin-Column) protokolü uygulanmıştır. DNA örnekleri, spektrometrik DNA ölçümü yapıldıktan sonra, çalışmanın gerçekleştirildiği tarihe kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

### **2.4. TG Gen Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Tekniği ile Belirlenmesi**

Çalışmamızda, TG geninde yer alan, E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin araştırılmasında PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Her bölge için, PCR reaksiyonunda gerekli olan primer çiftleri [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) sitesinden (giriş tarihi: mayıs, 2009), TG geninde çalıştığımız ekzon bölgeleri ile dağılımını araştırdığımız polimorfizmler bulunarak belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamındaki TG gen polimorfizmleri, TG genindeki yerleşimleri, primer dizileri ve PCR ürünlerinin uzunlukları Tablo 2.1.’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Hedef Bölgelerin, PCR Reaksiyonuyla Çoğaltılmasında Kullanılan Primer Dizileri ve PCR Ürünü Uzunlukları.

Polimorfizm	TG Genindeki Yerleşimi	Primer Dizileri <sup>a</sup>	PCR Ürününün Uzunluğu
<b>E10SNP24</b>	10. ekzon	F: 5'- AAC TGC CAC ATT TCT GC- 3' R: 5'-GAT CCT GGC CCT TGT TCT- 3'	438 bç
<b>E10SNP158</b>			
<b>E12SNP</b>	12. ekzon	F: 5'- CAG AGC CCA CAC AGA GCA GG- 3' R: 5'- AAA AAG GGG TGT CAC TTG GC- 3'	242 bç
<b>E21SNP</b>	21. ekzon	F: 5'- TTA CCC TGT GTG TTC TGG GA- 3' R: 5'- GGA AAC CCT GTT GAG TTC CA- 3'	294 bç
<b>E33SNP</b>	33. ekzon	F: 5'- ATA TTG ACC AAA GCA CCC CC- 3' R: 5'- ATT AGC CAG TTG CCC TCT CC- 3'	377 bç

<sup>a</sup> F: İleri (forward) primer dizisi, R: Geri (reverse) primer dizisi

Çalışmamızda, TG geni 10. ekzonundaki E10SNP24 ve E10SNP158, 12. ekzonundaki E12SNP, 21. ekzonundaki E21SNP ve 33. ekzonundaki E33SNP polimorfizmlerini içine alan hedef bölgeler PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Hedef bölgelerin çoğaltılması için uygun PCR reaksiyon protokolleri özgül primer çiftleri için belirtilen sentez bilgileri, Tm sıcaklıkları ve CG yüzdeleri dikkate alınarak oluşturulmuştur. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri, Orange G jel yükleme boyası ile karıştırılıp; etidyum bromür (EtBr) boyama kullanılarak hazırlanmış %2'lik agaroz jelde, moleküler ağırlık belirteci ile nükleotid uzunluğu doğrulanarak değerlendirilmiştir. Görüntüleme işlemi için UV (Ultraviyole) transillüminatör kullanılmış ve görüntülerin fotoğrafları alınmıştır.

Hedef bölgelerin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında, E10SNP24 bölgesindeki T/G, E10SNP158 bölgesindeki T/C, E12SNP bölgesindeki A/G, E21SNP bölgesindeki T/C ve E33SNP bölgesinde T/C baz değişimlerinin belirlenmesi için enzim kesim reaksiyonları uygulanmıştır. Bu aşamada, PCR ürünlerinin, bu baz değişikliklerini tanıyan restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Enzim kesim reaksiyonlarında kullandığımız restriksiyon

enzimlerinin veya izoşizomerlerinin hedef bölgeleri tanıma durumu <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> sitesi kullanılarak (giriş tarihi: mayıs, 2009) belirlenmiş ve/veya doğrulanmıştır. TG genine ilişkin, çalışmamızda yer alan polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim bölgeleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmleri İçin Beklenen Baz Değişimi ve Bu Değişiklikleri Tanıyan Restriksiyon Enzimlerinin Kesim Bölgeleri

Polimorfizm	Beklenen Baz Değişimi	Restriksiyon Enzimi	Tanıma Bölgesi <sup>a</sup>
<b>E10SNP24</b>	T/G	Bpu1102I	5'...G C ↓ T N A G C...3' 3'...C G A N T ↑ C G...5'
<b>E10SNP158</b>	T/C	Bpu10I	5'...C C ↓ T N A G C...3' 3'...G G A N T ↑ C G...5'
<b>E12SNP</b>	A/G	Ppu21I	5'...Y A C ↓ G T R...3' 3'...R T G ↑ C A Y...5'
<b>E21SNP</b>	T/C	MspI	5'...C ↓ C G G...3' 3'...G G C ↑ C...5'
<b>E33SNP</b>	T/C	TaaI	5'...A C N ↓ G T...3' 3'...T G ↑ N C A...5'

<sup>a</sup> N: A,G,C ve T; Y: T veya C; R: G veya A

Çalışmamızda yer alan TG gen polimorfizmleri için beklenen baz değişikliklerinin enzim kesim reaksiyonuyla belirlenmesinde ortak protokol uygulanmıştır. PCR ürünlerinin uygun restriksiyon enzimleri ile karıştırılarak kesilmesi aşamasında, ticari enzimler için önerilen enzim tamponları ve optimum inkübasyon sıcaklıkları tercih edilmiş; inkübasyon süresi 13-16 saat olarak uygulanmıştır. Bu süre sonunda elde edilen enzim kesim ürünleri, Orange G jel yükleme boyası ile karıştırılıp; Et Br boyama kullanılarak hazırlanmış agaroz jel elektroforezinde, moleküler ağırlık belirteciye göre nükleotid uzunlukları doğrulanarak değerlendirilmiştir. Görüntüleme işlemi için UV transillüminatör kullanılmış ve görüntülerin fotoğrafları alınmıştır.

TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin belirlenmesinde kullanılan enzim kesim reaksiyonu protokolü için gerekli reaksiyon bileşenleri Tablo 2.3'te belirtilmiş; restriksiyon enzimi hedef bölgelerinin uzunluğu, enzim kesim reaksiyonu için önerilen sıcaklık ve reaksiyon sonucu beklenen enzim kesim ürünlerinin uzunlukları Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.3.** TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Enzim Kesim Reaksiyonu Bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim (µl)</b>
dH <sub>2</sub> O	2
Restriksiyon enzim tamponu	2
Restriksiyon enzimi	1
PCR ürünü	15
<b>Toplam</b>	20

**Tablo 2.4.** TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Restriksiyon Enzimlerine Ait İnkübasyon Sıcaklıkları ve Beklenen Enzim Kesim Ürünlerinin Uzunlukları.

Polimorfizm	Beklenen Baz Değişimi	PCR Ürünü Uzunluğu (bç)	Restriksiyon Enzimi	İnkübasyon Sıcaklığı	Enzim Kesim Ürünlerinin Uzunlukları (bç)
<b>E10SNP24</b>	T/G	438 bç	Bpu1102I	37 °C	TT: 438 TG: 438, 249, 188 GG:249, 188
<b>E10SNP158</b>	T/C	438 bç	Bpu10I	37 °C	TT: 438 TC: 438, 381, 56 CC: 381, 56
<b>E12SNP</b>	A/G	242 bç	Ppu21I	30 °C	AA: 242 AG: 242, 136, 106 GG: 136, 106
<b>E21SNP</b>	T/C	294 bç	MspI	37 °C	TT: 294 TC: 294, 205, 89 CC: 205, 89
<b>E33SNP</b>	T/C	377 bç	TaaI	65 °C	TT: 264, 113 TC: 264, 168, 113, 96 CC: 168, 113, 96

#### 2.4.1. E10SNP24 ve E10SNP 158 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

TG geninin 10. ekzonundaki, E10SNP24 ve E10SNP158 polimorfizmlerini içine alan 438 bç uzunluğundaki bölge, Tablo 2.1’de gösterilen özgül primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. TG geni 10. ekzon hedef bölgesine ilişkin olarak kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 2.5’te ve uygulanan PCR reaksiyon programı Tablo 2.6’da belirtilmiştir.

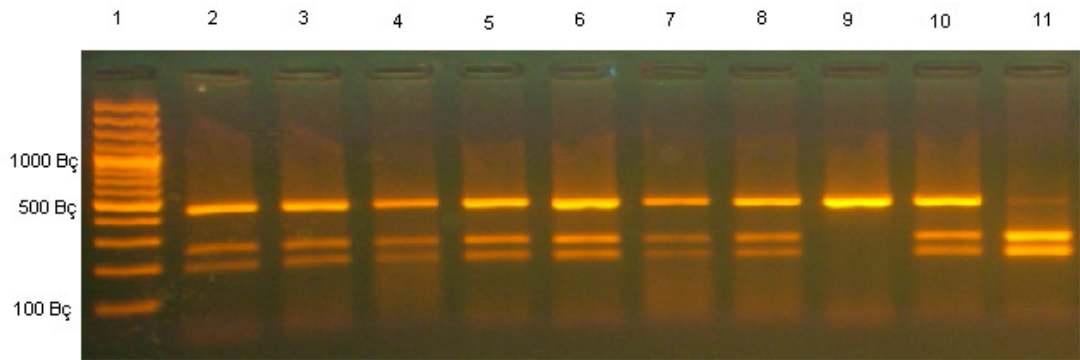
**Tablo 2.5.** TG Geni 10. Ekzon Bölgesindeki, E10SNP24 ve E10SNP158 Polimorfizmlerini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	35,6
10X PCR tamponu	5
dNTP	1
F. Primer (100pmol/µl)	1
R. Primer (100pmol/µl)	1
MgCl <sub>2</sub>	3
Taq DNA Polimeraz	0,4
DNA	3
<b>Toplam</b>	<b>50</b>

**Tablo 2.6.** TG Geni 10. Ekzon Bölgesindeki, E10SNP24 ve E10SNP158 Polimorfizmlerini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı

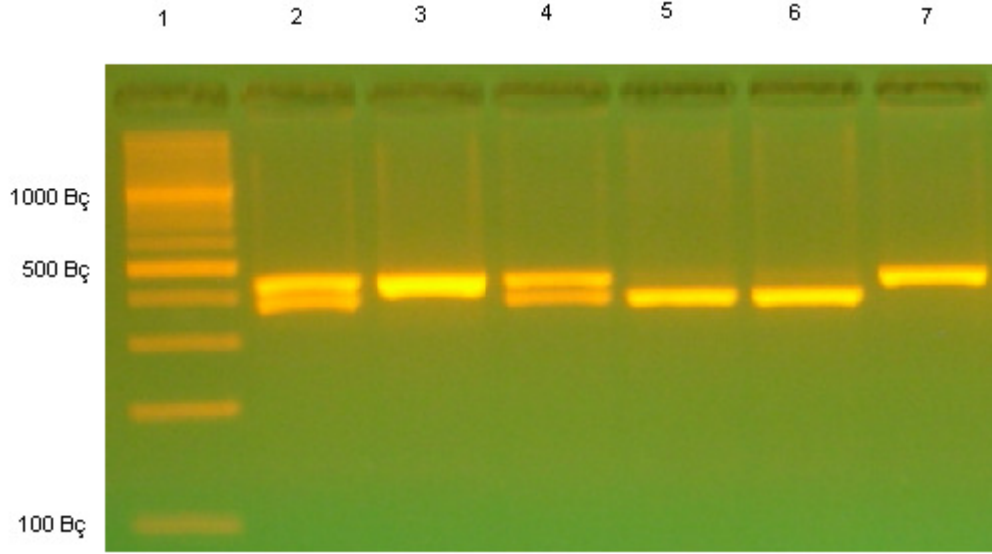
Bölge	Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
<b>10. Ekzon</b>	İlk denatürasyon Basamağı	95 °C	5 dakika	1
	Denatürasyon Basamağı	95 °C	30 saniye	35
	Primer bağlanma Basamağı	55 °C	30 saniye	
	Uzama basamağı	72 °C	1 dakika	
	Son uzama basamağı	72 °C	5 dakika	1

TG geni 10. ekzonunda yer alan hedef bölgenin, PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında elde edilen PCR ürünleri, E10SNP24 polimorfizminin belirlenmesi amacıyla, Bpu 1102I restriksiyon enzimi ile, Tablo 2.3'te belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak; 37 °C'de 1 gece (16 saati geçmeyecek şekilde) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 150 volt sabit akımda yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** E10SNP24 Bölgesinin Bpu 1102I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.  
Sütun 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci, Sütun 2- Sütun 8: TG genotipi, Sütun 9: TT genotipi, Sütun 10: TG genotipi, Sütun 11 GG genotipi.

TG geni 10. ekzonunda yer alan hedef bölgenin, PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında elde edilen PCR ürünleri, E10SNP158 polimorfizminin belirlenmesi amacıyla, Bpu 10I restriksiyon enzimi ile, Tablo 2.3'te belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak; 37 °C'de 1 gece (16 saati geçmeyecek şekilde) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci, %3'lük agaroz jel elektroforezinde 100 volt sabit akımda yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.2.** E10SNP158 Bölgesinin Bpu 10I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %3'lük Agaroz Jeldeki Görüntüsü.  
 Sütun 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci, Sütun 2: TC genotipi,  
 Sütun 3: TT genotipi, Sütun 4: TC genotipi, Sütun 5-Sütun 6: CC genotipi,  
 Sütun 7: TT genotipi.

#### 2.4.2. E12SNP Polimorfizminin Belirlenmesi

TG geninin 12. ekzonunda, E12SNP polimorfizmini içine alan 242 bç uzunluğundaki uzunluğundaki hedef bölge, Tablo 2.1'de gösterilen özgül primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. TG geni 12. ekzon hedef bölgesine ilişkin olarak kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 2.7'de ve uygulanan PCR programı Tablo 2.8'de belirtilmiştir.



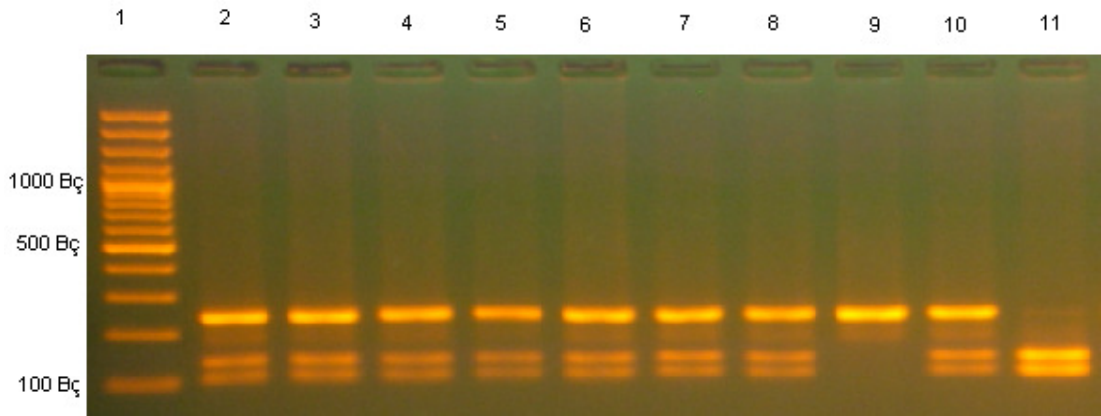
**Tablo 2.7.** TG Geni 12. Ekzon Bölgesindeki, E12SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	16,8
10X Hot Start PCR tamponu	2,5
dNTP	0,5
F. Primer (100pmol/µl)	0,5
R. Primer (100pmol/µl)	0,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
DMSO	0,5
Hot Start Taq DNA Polimeraz	0,2
DNA	2
<b>Toplam</b>	25

**Tablo 2.8.** TG Geni 12. Ekzon Bölgesindeki, E12SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı

Bölge	Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
<b>12. Ekzon</b>	İlk denatürasyon Basamağı	95 °C	5 dakika	1
	Denatürasyon Basamağı	95 °C	30 saniye	35
	Primer bağlanma Basamağı	64 °C	30 saniye	
	Uzama basamağı	72 °C	1 dakika	
	Son uzama basamağı	72 °C	5 dakika	1

TG geni 12. ekzonunda yer alan hedef bölgenin, PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında elde edilen PCR ürünleri, E12SNP polimorfizminin belirlenmesi amacıyla, Ppu21I restriksiyon enzimi ile Tablo 2.3'te belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak; 30 °C'de 1 gece (16 saati geçmeyecek şekilde) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 150 volt sabit akımda yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.3'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.3.** E12SNP Bölgesinin Ppu21I ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.

Sütun 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci,  
Sütun 2- Sütun 8: AG genotipi, Sütun 9: AA genotipi,  
Sütun 10: AG genotipi, Sütun: 11: GG genotipi.

#### 2.4.3. E21SNP Polimorfizminin Belirlenmesi

TG geninin 21. ekzonunda, E12SNP polimorfizmini içine alan 294 bç uzunluğundaki uzunluğundaki hedef bölge, Tablo 2.1'de gösterilen özgül primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. TG geni 21. ekzon hedef bölgesine ilişkin olarak kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 2.9'da ve uygulanan PCR programı Tablo 2.10'de belirtilmiştir.

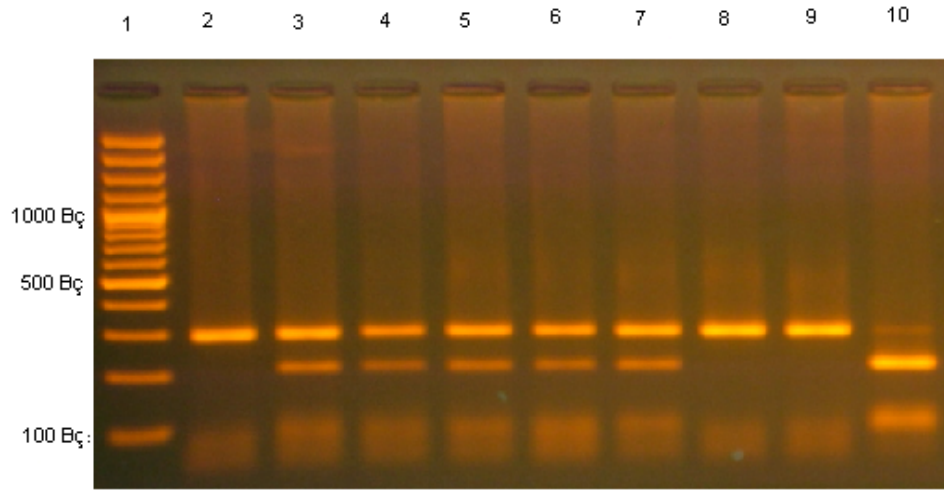
**Tablo 2.9.** TG Geni 21. Ekzon Bölgesindeki, E21SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	15,8
10X PCR tamponu	2,5
dNTP	0,5
F. Primer (100pmol/µl)	0,5
R. Primer (100pmol/µl)	0,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
Taq DNA Polimeraz	0,2
DNA	2,5
<b>Toplam</b>	25

**Tablo 2.10.** TG Geni 21. Ekzon Bölgesindeki, E21SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı

Bölge	Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
<b>21. Ekzon</b>	İlk denatürasyon Basamağı	95 °C	5 dakika	1
	Denatürasyon Basamağı	95 °C	30 saniye	35
	Primer bağlanma Basamağı	60 °C	30 saniye	
	Uzama basamağı	72 °C	1 dakika	
	Son uzama basamağı	72 °C	5 dakika	1

TG geni 21. ekzonunda yer alan hedef bölgenin, PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında elde edilen PCR ürünleri, E21SNP polimorfizminin belirlenmesi amacıyla, MspI restriksiyon enzimi ile Tablo 2.3'te belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak; 37 °C'de 1 gece (16 saati geçmeyecek şekilde) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 150 volt sabit akımda yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.4'de açıklanmaktadır.



**Şekil 2.4.** E21SNP Bölgesinin MspI ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.  
Sütun 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci, Sütun 2: TT genotipi,  
Sütun 3 - Sütun 7: TC genotipi, Sütun 8-Sütun 9: TT genotipi,  
Sütun 10: CC genotipi.

#### 2.4.4. E33SNP Polimorfizminin Belirlenmesi

TG geninin 33. ekzonunda, E33SNP polimorfizmini içine alan 377 bç uzunluğundaki uzunluğundaki hedef bölge, Tablo 2.1'de gösterilen özgül primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. TG geni 33. ekzon hedef bölgesine ilişkin olarak kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 2.11'de ve uygulanan PCR programı Tablo 2.12'de belirtilmiştir.

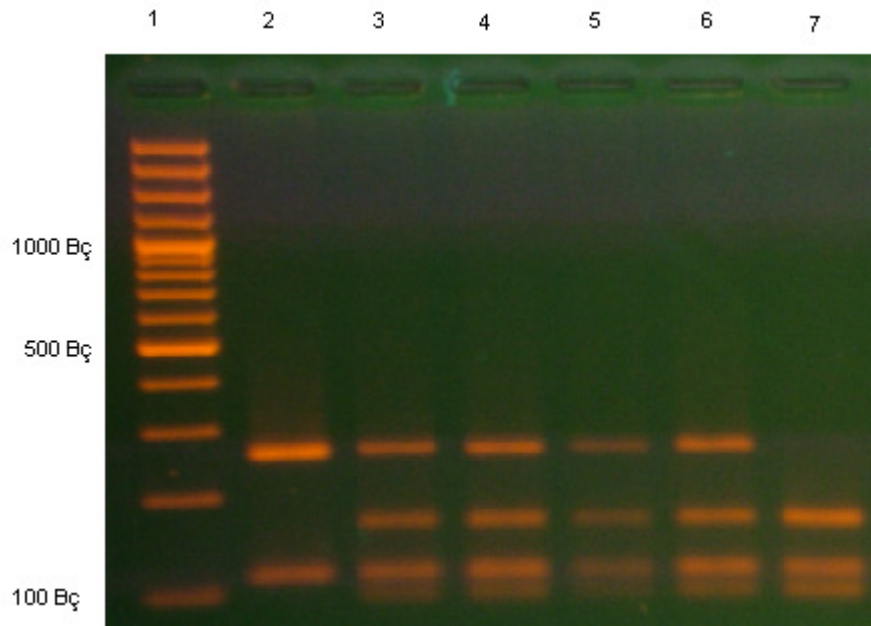
**Tablo 2.11.** TG Geni 33. Ekzon Bölgesindeki, E33SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
10X Hot Start PCR tamponu	2,5
dNTP	0,5
F. Primer (100pmol/µl)	0,5
R. Primer (100pmol/µl)	0,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
Hot Start Taq DNA Polimeraz	0,2
DNA	2
<b>Toplam</b>	25

**Tablo 2.12.** TG Geni 33. Ekzon Bölgesindeki, E33SNP Polimorfizmini İçine Alan Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı

Bölge	Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
<b>33. Ekzon</b>	İlk denatürasyon Basamağı	95 °C	5 dakika	1
	Denatürasyon Basamağı	95 °C	30 saniye	35
	Primer bağlanma Basamağı	62 °C	30 saniye	
	Uzama basamağı	72 °C	1 dakika	
	Son uzama basamağı	72 °C	5 dakika	1

TG geni 33. ekzonunda yer alan hedef bölgenin, PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonrasında elde edilen PCR ürünleri, E33SNP polimorfizminin belirlenmesi amacıyla, TaaI restriksiyon enzimi ile Tablo 2.3'te belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak; 65 °C'de 1 gece (16 saati geçmeyecek şekilde) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 150 volt sabit akımda yürütülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.5'te açıklanmaktadır.



**Şekil 2.5.** E33SNP Bölgesinin TaaI ile Kesimi Sonucu Oluşan Enzim Kesim Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü.  
Sütun 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci, Sütun 2: TT genotipi,  
Sütun 3-Sütun 6: TC genotipi, Sütun 7: CC genotipi.

## 2.5. HLA-DR3 Allelinin PCR-SSP Tekniği ile Belirlenmesi:

Çalışmamızda, HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) allelinin varlığı, PCR-SSP yöntemi ile HLA-DR analizi yapılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, kullandığımız ticari kit için önerilen PCR reaksiyon bileşenleri ve PCR programı uygulanmıştır.

PCR-SSP HLA-DR analiz yönteminde kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri Tablo 2.13'te ve PCR programı Tablo 2.14'te açıklanmıştır.

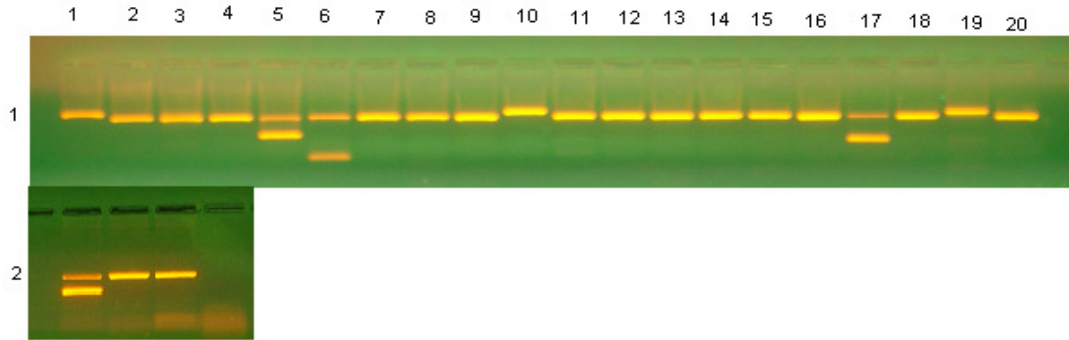
**Tablo 2.13.** PCR-SSP Yönteminde, HLA-DR Analizi İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Bileşenleri.

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim (µl)</b>
PCR master mix	84
Taq polimeraz	2,2
dH <sub>2</sub> O	132,8
DNA	54
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

**Tablo 2.14.** PCR-SSP Yönteminde, HLA-DR Analizi İçin Kullanılan PCR Reaksiyon Programı.

<b>Bölge</b>	<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
<b>HLA-DR</b>	İlk denatürasyon basamağı	94 °C	2 dakika	1
	Denatürasyon basamağı	94 °C	10 saniye	10
	Primer bağlanma ve uzama basamağı	65 °C	1 dakika	
	Denaturasyon basamağı	94 °C	10 saniye	20
	Primer bağlanma basamağı	61 °C	50 saniye	
	Uzama basamağı	72 °C	30 saniye	

PCR sonrasında, HLA-DR hedef DNA dizisinin çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünleri, EtBr boyama kullanılarak hazırlanmış %2'lik agaroz jel elektroforezinde, 150 volt sabit akımda yürütülmüştür. Görüntüleme işlemi için UV transillüminatör kullanılmış ve görüntülerin fotoğrafları alınmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2.6'da özetlenmiştir.



**Şekil 2.6.** PCR-SSP HLA-DR Analiz Yönteminde, HLA-DR3 Allelin Varlığını Gösteren %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.

Satır 1: Sütun 5, Sütun 6 ve Sütun 17'de görülen çift bant ile belirlenmiş HLA-DR3 varlığı; Satır 2: Sütun 1'de görülen çift bant ile belirlenmiş ve HLA-DR3 varlığını doğrulayan HLA-DRB3 varlığı.

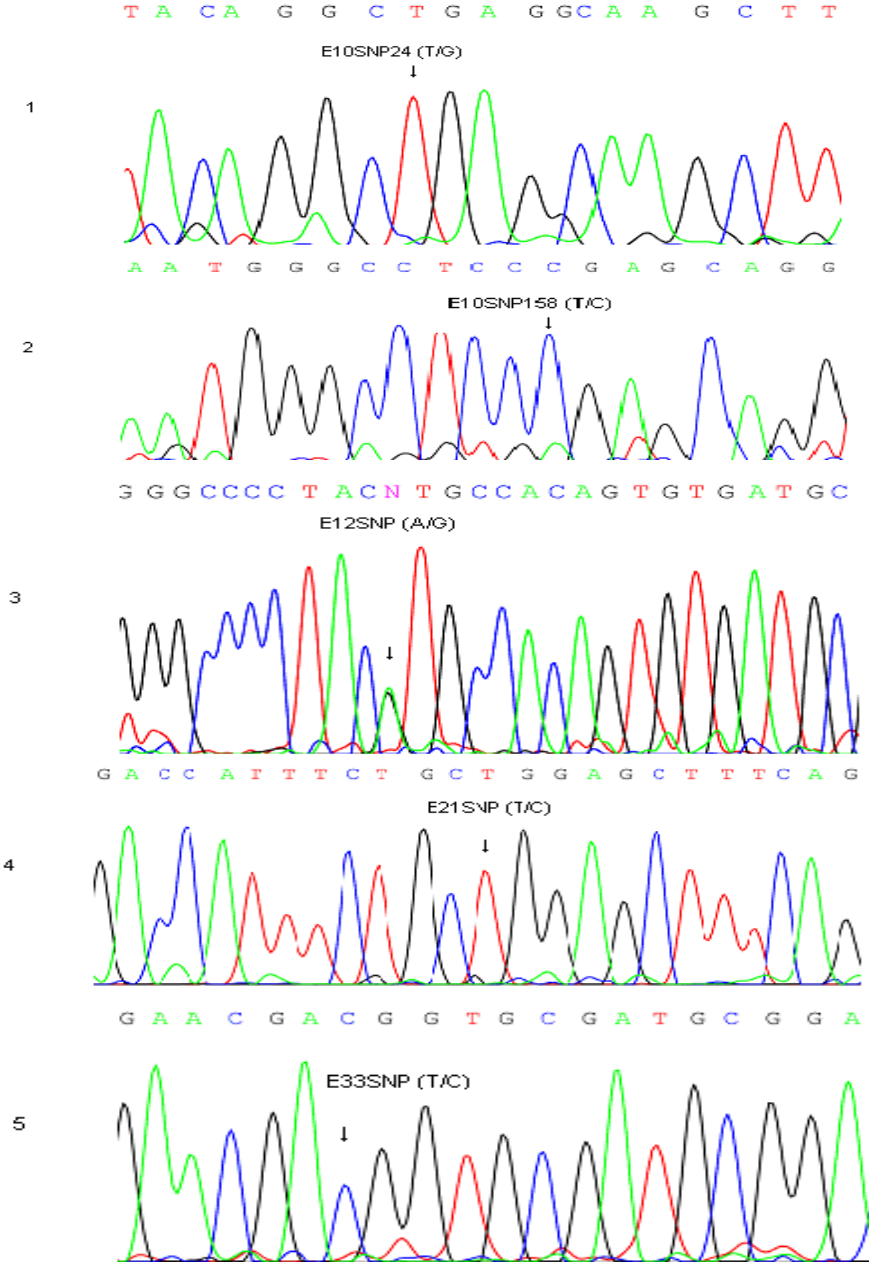
## 2.6. DNA Dizi Analizi:

Çalışmamızda, PCR-RFLP yöntemiyle elde ettiğimiz verilerin kontrolü amacıyla; TG genindeki 10. ekzon hedef bölgesi için 8 örnek ( 3 GH, 3 HT, 2 kontrol), 12. ekzon hedef bölgesi için 4 örnek ( 2 HT, 2 kontrol), 21. ekzon hedef bölgesi için 4 örnek ( 1 GH, 1 HT, 2 kontrol) ve 33. ekzon hedef bölgesi için 4 örnek (2 GH, 2 kontrol) olacak şekilde, toplam 20 örnekte DNA dizi analizi yapılmıştır.

DNA dizi analizi için, örneklerin PCR aşaması PCR-RFLP yönteminde bahsettiğimiz şekilde yapılmış; elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırması ve dizi analizi aşaması, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi sonuçları Chromas Lite 2.01 programı ile



bilgisayar ortamında değerlendirilmiştir. TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP bölgelerinin dizi analizi sonuçları Şekil 2.7' de gösterilmiştir



**Şekil 2.7.** TG geni E10SNP24 T/G , E10SNP158 T/C, E12SNP A/G, E21SNP T/C ve E33SNP T/C Polimorfizmlerinin DNA Dizi Analizi Görüntüsü.  
 Satır 1: E10SNP24 TT genotipi, Satır 2: E10SNP158 CC genotipi  
 Satır 3: E12SNP AG genotipi, Satır 4: E21SNP TT genotipi  
 Satır 5: E33SNP CC genotipi

## 2.7. İstatistik Analizleri:

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde “SPSS 11,5 for Windows” programı kullanılmıştır. TG gen polimorfizmlerine ilişkin PCR-RFLP yöntemiyle, GH grubu, HT grubu ve kontrol grubundan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, her bir gruptaki genotip frekansı dikkate alınarak “ $\chi^2$ ” testi, allel frekansı dikkate alınarak “Fischer’ Exact” testi kullanılmıştır. PCR-SSP yöntemi ile elde edilen veriler için, GH grubu ve kontrol grubunda HLA-DR3 varlığının değerlendirilmesinde “Fischer’ Exact” testi; GH grubu ve kontrol grubunda görülen HLA-DR3 varlığının, çalışmamızda yer alan TG gen polimorfizmleriyle, genotip ilişkisinin değerlendirilmesinde  $\chi^2$  testi, allel ilişkisinin değerlendirilmesinde Fischer’ Exact testi kullanılmıştır. Çalışmamızda, GH, HT ve kontrol grupları arasında, allel ve genotip düzeyinde, tahmini rölatif risk oranı (TRR) ve %95 güven aralığı (GA) hesaplanmıştır. Çalışmamızda yer alan TG gen polimorfizmlerinin, GH, HT ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu  $\chi^2$  testi ile değerlendirilmiştir. Hesaplanan p değerleri, 0,05 değerinin altında anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. TG Geninin OTH ile İlişkisi

Çalışmamızda, TG geninde araştırdığımız polimorfizmlerin allel ve genotip dağılımlarına ilişkin verileri değerlendirirken, GH ve HT grupları, OTH olarak bir grupta incelenmiştir. OTH grubu ile kontrol grubunda gözlemlenen allel ve genotip dağılımları karşılaştırıldığında, sadece E33SNP polimorfizminin, OTH grubundaki genotip dağılımları ile kontrol grubundaki genotip dağılımları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p: 0,038). E33SNP TT genotipinin OTH grubunda görülme sıklığı %7,9, kontrol grubunda görülme sıklığı %20,0 olarak belirlenmiştir. E33SNP CC genotipi OTH grubunda %40,7 oranında görülürken, kontrol grubunda %35,7 oranında gözlemlenmiştir. E33SNP TC genotipinin OTH ve kontrol grubunda görülme sıklığı sırasıyla %51,4 ve %44,3 olarak belirlenmiştir. E33SNP bölgesi, allel açısından değerlendirildiğinde; OTH ve kontrol gruplarında, T ve C allellerinin dağılımları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E21SNP polimorfizmlerine ilişkin, OTH ve kontrol gruplarında gözlemlenen allel ve genotip dağılımları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda, OTH grubu ve kontrol grubunda gözlemlenen genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uygun bulunmuştur.

OTH ve kontrol gruplarında, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerine ilişkin allel ve genotip dağılımları Tablo 3.1'de özetlenmektedir.

**Tablo 3.1.** OTH ve Kontrol Gruplarında, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Allel ve Genotip Dağılımları

Polimorfizm	Genotip/Allel	OTH [n=140 (%)]	Kontrol [n=70 (%)]	X <sup>2</sup>	P Değeri
<b>E10SNP24</b>	TT	25 (17,9)	8 (11,4)	4,349 <sup>a</sup>	0,114
	TG	61 (43,6)	41 (58,6)		
	GG	54 (38,6)	21 (30,0)		
	T	111 (39,6)	57 (40,7)	0,045 <sup>b</sup>	0,833
	G	169 (60,4)	83 (59,3)		
<b>E10SNP158</b>	TT	54 (38,6)	22 (31,4)	3,246 <sup>a</sup>	0,197
	TC	62 (44,3)	40 (57,1)		
	CC	24 (17,1)	8 (11,4)		
	T	170 (60,7)	84 (60,0)	0,020 <sup>b</sup>	0,888
	C	110 (39,3)	56 (40,0)		
<b>E12SNP</b>	AA	32 (22,9)	9 (12,9)	3,020 <sup>a</sup>	0,221
	AG	69 (49,3)	40 (57,1)		
	GG	39 (27,9)	21 (30,0)		
	A	133 (47,5)	58 (41,4)	1,388 <sup>b</sup>	0,239
	G	147 (52,5)	82 (58,6)		
<b>E21SNP</b>	TT	32 (22,9)	20 (28,6)	1,653 <sup>a</sup>	0,438
	TC	75 (53,6)	31 (44,3)		
	CC	33 (23,6)	19 (27,1)		
	T	139 (49,6)	71 (50,7)	0,043 <sup>b</sup>	0,836
	C	141 (50,4)	69 (49,3)		
<b>E33SNP</b>	TT	11 (7,9)	14 (20,0)	6,564 <sup>a</sup>	<b>0,038</b>
	TC	72 (51,4)	31 (44,3)		
	CC	57 (40,7)	25 (35,7)		
	T	94 (33,6)	59 (42,1)	2,961 <sup>b</sup>	0,085
	C	186 (66,4)	81 (57,9)		

<sup>a</sup> Serbestlik derecesi 2, <sup>b</sup> Serbestlik derecesi 1

Çalışmamızda, OTH ve kontrol gruplarında E33SNP polimorfizmine ilişkin genotip dağılımları %95 GA'nda TRR değerleri hesaplanmak üzere karşılaştırılmıştır. TT genotipinin CC ve TC genotipleri ile karşılaştırılması sonucu, TT genotipine ait TRR değeri 2,932 olarak hesaplanmış ve bu değer %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. TC genotipinin TT ve CC ile, CC genotipinin TT ve TC genotipleri ile karşılaştırılması sonucunda belirlenen TRR değerleri ise, %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

OTH ve kontrol gruplarında E33SNP bölgesindeki genotip dağılımlarının karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler Tablo 3.2' de özetlenmektedir.

**Tablo 3.2** OTH ve Kontrol Gruplarında E33SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

E33SNP <sup>a</sup>	OTH [n=140 (%)]	Kontrol [n=70 (%)]	%95 GA <sup>b</sup>	TRR <sup>c</sup>	P Değeri
TT TC+CC	11 (7,9) 129 (%92,1)	14 (20,0) 56 (80,0)	1,253-6,857 <sup>d</sup>	2,932 <sup>d</sup>	<b>0,011</b>
TC TT+CC	72 (51,4) 68 (48,6)	31 (44,3) 39(55,7)	0,748-2,371	1,332	0,329
CC TT+TC	57(40,7) 83 (49,3)	25 (35,7) 45 (64,3)	0,683-2,239	1,236	0,292

<sup>a</sup> E33SNP bölgesine ilişkin genotipler, <sup>b</sup> Güven Aralığı, <sup>c</sup> Tahmini Rölatif Risk  
<sup>d</sup> Kontrol grubunun OTH grubu ile karşılaştırılması sonucu hesaplanan değerler

### 3.2. TG Geninin GH ve HT Hastalığı ile İlişkisi

Çalışmamızda, TG geninde araştırdığımız polimorfizmlerin allel ve genotip dağılımlarına ilişkin verileri değerlendirirken, GH ve HT grupları ayrı gruplar olarak değerlendirilmiştir. GH, HT ve kontrol gruplarında gözlemlenen allel ve genotip dağılımları karşılaştırıldığında, sadece E12SNP bölgesinin, 3 grupta gözlemlenen genotip dağılımları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur

(p: 0,033). E12SNP bölgesi AA genotipinin görülme sıklığı; GH'nda %24,3, HT'nde %21,4, kontrol grubunda ise %12,9 olarak belirlenmiştir. E12SNP GG genotipi; GH'nda %37,1, HT'nde %18,6, kontrol grubunda ise %30.0 oranında gözlemlenmiştir. AG genotipinin GH, HT ve kontrol grubundaki görülme sıklığı sırasıyla; %38,6, %60,0 ve %57,1 olarak belirlenmiştir. E12SNP bölgesi için, 3 grupta elde edilen allel frekansları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E21SNP polimorfizmlerine ilişkin, GH, HT ve kontrol gruplarında gözlemlenen allel ve genotip dağılımları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda, GH ve HT grubunda gözlemlenen genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uygun bulunmuştur.

GH, HT ve kontrol gruplarında, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerine ilişkin allel ve genotip dağılımları Tablo 3.3.'te özetlenmektedir.

**Tablo 3.3.** GH, HT ve Kontrol Gruplarında, TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerine İlişkin Allel ve Genotip Dağılımları.

Polimorfizm	Genotip / Allel	GH [n=70,(%)]	HT [n=70,(%)]	Kontrol [n=70,(%)]	X <sup>2</sup>	P Değeri
<b>E10SNP24</b>	TT	15 (21,4)	10 (14,3)	8 (11,4)	5,853 <sup>a</sup>	0,210
	TG	28 (40,0)	33 (47,1)	41 (58,6)		
	GG	27 (38,6)	27 (38,6)	21 (30,0)		
	T	58 (41,4)	53 (37,9)	57 (40,7)	0,417 <sup>b</sup>	0,812
	G	82 (58,6)	87 (62,1)	83 (59,3)		
<b>E10SNP158</b>	TT	27 (38,6)	27 (38,6)	22 (31,4)	3,492 <sup>a</sup>	0,479
	TC	30 (42,9)	32 (45,7)	40 (57,1)		
	CC	13 (18,6)	11 (15,7)	8 (11,4)		
	T	84 (60,0)	86 (61,4)	84 (60,0)	0,080 <sup>b</sup>	0,961
	C	56 (40,0)	54 (38,6)	56 (40,0)		
<b>E12SNP</b>	AA	17 (24,3)	15 (21,4)	9 (12,9)	10,488 <sup>a</sup>	<b>0,033</b>
	AG	27 (38,6)	42 (60,0)	40 (57,1)		
	GG	26 (37,1)	13 (18,6)	21 (30,0)		
	A	61 (43,6)	72 (51,4)	58 (41,4)	3,130 <sup>b</sup>	0,209
	G	79 (56,4)	68 (48,6)	82 (58,6)		
<b>E21SNP</b>	TT	12 (17,1)	20 (28,6)	20 (28,6)	4,927 <sup>a</sup>	0,295
	TC	38 (54,3)	37 (52,9)	31 (44,3)		
	CC	20 (28,6)	13 (18,6)	19 (27,1)		
	T	62 (44,3)	77 (55,0)	71 (50,7)	3,257 <sup>b</sup>	0,196
	C	78 (55,7)	63 (45,0)	69 (49,3)		
<b>E33SNP</b>	TT	5 (7,1)	6 (8,6)	14 (20,0)	6,643 <sup>a</sup>	0,156
	TC	36 (51,4)	36 (51,4)	31 (44,3)		
	CC	29 (41,4)	28 (40,0)	25 (35,7)		
	T	46 (32,9)	48 (34,3)	59 (42,1)	3,023 <sup>b</sup>	0,221
	C	94 (67,1)	92 (65,7)	81 (57,9)		

<sup>a</sup> Serbestlik derecesi 2, <sup>b</sup> Serbestlik derecesi 1

GH ve kontrol gruplarında, E12SNP bölgesine ilişkin gözlemlenen genotip dağılımları dikkate alınarak, AG genotipinin AA ve GG genotipleri ile karşılaştırılması sonucunda; AG genotipine ait TRR değeri 2,123 olarak belirlenmiş ve bu değer %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. AA genotipinin AG ve GG ile, GG genotipinin AA ve AG genotipleri ile karşılaştırılması sonucu hesaplanan TRR değerleri, %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

GH ve kontrol gruplarında, E12SNP bölgesinde gözlemlenen genotip dağılımlarının karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler Tablo 3.4'te özetlenmektedir.

**Tablo 3.4.** GH ve Kontrol Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

E12SNP <sup>a</sup>	GH [n=70 (%)]	Kontrol [n=70 (%)]	%95 GA <sup>b</sup>	TRR <sup>c</sup>	P değeri
AA AG + GG	17 (24,3) 53 (75,7)	9 (12,9) 61 (87,1)	0,895-5,283	2,147	0,082
AG AA + GG	27 (38,6) 43 (61,4)	40 (57,1) 30 (42,9)	1,081-4,171 <sup>d</sup>	2,123 <sup>d</sup>	<b>0,028</b>
GG AA + AG	26 (37,1) 44 (62,9)	21 (30,0) 49 (70,0)	0,682-2,789	1,379	0,371

<sup>a</sup> E12SNP bölgesine ilişkin genotipler, <sup>b</sup> Güven Aralığı, <sup>c</sup> Tahmini Rölatif Risk

<sup>d</sup> Kontrol grubunun GH grubu ile karşılaştırılması sonucu hesaplanan değerler

HT ve kontrol gruplarında E12SNP bölgesinde gözlemlenen genotip dağılımları karşılaştırıldığında, AA, AG ve GG genotiplerine ait hesaplanan TRR değerleri, %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Sonuçlar Tablo 3.5'te özetlenmektedir.

**Tablo 3.5.** HT ve Kontrol Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

E12SNP <sup>a</sup>	HT [n=70 (%)]	Kontrol [n=70 (%)]	%95 GA <sup>b</sup>	TRR <sup>c</sup>	P değeri
AA AG + GG	15 (21,4) 55 (78,6)	9 (12,9) 61 (87,1)	0,749-4,561	1,848	0,178
AG AA + GG	42 (60,0) 28 (40,0)	40 (57,1) 30 (42,9)	0,574-2,205	1,125	0,731
GG AA + AG	13 (18,6) 57 (81,4)	21 (30,0) 49 (70,0)	0,242-1,173	0,532	0,115

<sup>a</sup> E12SNP bölgesine ilişkin genotip, <sup>b</sup> Güven Aralığı, <sup>c</sup> Tahmini Rölatif Risk



Çalışmamızda, GH ve HT hasta gruplarında E12SNP bölgesinde gözlemlenen genotip dağılımları karşılaştırılmıştır. AG genotipinin AA ve GG genotipleri ile karşılaştırılması sonucu, AG genotipine ait TRR değeri 2,389 olarak belirlenmiş ve bu değer %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. GG genotipinin AA ve GG genotipleri ile karşılaştırılması sonucu, GG genotipine ait TRR değeri 2,591 olarak hesaplanmış ve bu değer %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. AA genotipinin AG ve GG genotipi ile karşılaştırılması sonucu belirlenen TRR değeri ise, %95 GA'nda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

GH ve HT gruplarında, E12SNP bölgesinde gözlemlenen genotip dağılımlarının karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler Tablo 3.6'te özetlenmektedir.

**Tablo 3.6.** GH ve HT Gruplarında E12SNP Bölgesi Genotip Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

E12SNP <sup>a</sup>	GH [n=70 (%)]	HT [n=70 (%)]	%95 GA <sup>b</sup>	TRR <sup>c</sup>	P değeri
AA AG + GG	17 (24,3) 53 (75,7)	15 (21,4) 55 (78,6)	0,534-2,592	1,176	0,687
AG AA + GG	27 (38,6) 43 (61,4)	42 (60,0) 28 (40,0)	1,212-4,708 <sup>d</sup>	2,389 <sup>d</sup>	<b>0,011</b>
GG AA + AG	26 (37,1) 44 (62,9)	13 (18,6) 57 (81,4)	1,196-5,614	2,591	<b>0,014</b>

<sup>a</sup> E12SNP bölgesine ilişkin genotipler, <sup>b</sup> Güven Aralığı, <sup>c</sup> Tahmini Rölatif Risk

<sup>d</sup> HT grubunun GH grubu ile karşılaştırılması sonucu hesaplanan değerler.

### 3.3. GH'nda, TG Gen Polimorfizmleri ile HLA-DR3 İlişkisi

Çalışmamızda PCR-SSP yöntemi ile, GH grubu ve kontrol grubunda HLA-DR3 analizi yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında; GH'nda HLA-DR3

varlığı %24,3, kontrol grubunda ise %18,6 oranında gözlemlenmiş; ancak HLA-DR3 varlığı yönünden iki grup arasında gözlemlenen farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır. Sonuçlar Tablo 3.7.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.7.** GH ve Kontrol gruplarında HLA-DR3 Varlığının Karşılaştırılması

Grup	HLA-DR3 (+) [n =70 (%)]	HLA-DR3 (-) [n =70 (%)]	X <sup>2</sup>	P Değeri
<b>GH</b>	17 (24,3)	53 (75,7)	0,679 <sup>a</sup>	0,410
<b>Kontrol</b>	13 (18,6)	57 (81,4)		

<sup>a</sup> Serbestlik derecesi 1

HLA-DR3 saptanmış GH grubu ve kontrol grubunda, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E33SNP bölgeleri için, allel ve genotip dağılımı değerlendirilmiştir; ancak bu iki grup gözlemlenen değerler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Tablo 3.8'de yer almaktadır.

**Tablo 3.8.** HLA-DR3 (+) Graves Hastaları ve HLA-DR3 (+) Kontrollerde TG Geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP Polimorfizmlerinin HLA-DR3 ile Birlikteliği

SNP	Allel X <sup>2</sup>	Sd <sup>a</sup>	P Değeri	Genotip X <sup>2</sup>	Sd <sup>a</sup>	P Değeri
<b>E10SNP24</b>	0,005	1	0,944	0,475	2	0,789
<b>E10SNP158</b>	0,005	1	0,944	0,475	2	0,789
<b>E12SNP</b>	0,271	1	0,602	0,257	2	0,879
<b>E21SNP</b>	0,950	1	0,330	3,497	2	0,174
<b>E33SNP</b>	1,187	1	0,276	2,525	2	0,283

<sup>a</sup> Serbestlik derecesi

### **3.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları**

Çalışmamızda; GH grubundan 6, HT hasta grubundan 6 ve kontrol grubundan 8 örnek olacak şekilde toplam 20 örnek için, DNA dizi analizi uygulanmıştır. Ekzon 10 için 8 örnek; ekzon 12, ekzon 21 ve ekzon 33 bölgelerinin her biri için 4 örnekte; DNA dizi analizi sonuçları ile aynı örneklerin PCR-RFLP reaksiyon sonuçları birbirleri ile uyumlu bulunmuştur.

## 4. TARTIŞMA

OTH grubunda incelenen GH ve HT hastalığının, genetik yatkınlığı olan bireylerde, tiroid antijenlerine karşı gelişen hücresel ve humoral immün yanıtın birlikteliğine bağlı olarak oluştuğu bilinmekte; bu yanıtın çevresel uyaranların etkisiyle geliştiği tahmin edilmektedir (Brown, 2009).

OTH'na ilişkin, iyot kullanımının yeterli olduğu farklı populasyonlarda yapılmış epidemiyolojik çalışmalarda, GH ile HT prevalansı ve insidansı karşılaştırıldığında, birbirine benzer sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir. Coğrafik koşulları birbirinden farklı olan bu populasyonlarda, iyot faktörü dışında kalan çevresel koşulların birbirinden farklı olması nedeniyle, OTH gelişiminde kalıttan gelen etkinin güçlü olduğu vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, Farklı beyaz ırk populasyonlarında, OTH'na ilişkin olarak belirlenmiş bazı duyarlılık genlerin ortak olmasının da, genetik faktörlerin önemini vurguladığı belirtilmektedir (Tomer and Davies , 2003).

OTH görülen ailelerde yapılmış bir çalışmada, etkilenmiş bireylerin kardeşlerinin %33'ünde GH ve HT'nin geliştiğinin gösterilmiş olduğu belirtilmektedir (Hall and Stanbury, 1967). Günümüze daha yakın bir veri olarak ise, GH tanısı almış, oftalmopati görülen hastaların %36'nın ailesinde, OTH öyküsünün bulunduğunu; %24'ünün ise birinci derece akrabalarında OTH'nın görüldüğünü bildirmişlerdir (Villanueva, 2000).

Kompleks hastalıklarda, genetik yatkınlığın değerlendirilmesi için elverişli bir yöntem olarak kabul edilen ikiz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; Danimarka'da, GH'nın monozigot ikizlerde (MZ) konkordansının %35, dizigot ikizlerde (DZ) ise %3 olduğu gösterilmiştir (Brix, 2001). Kaliforniya'da yapılmış bir diğer çalışma ile, Danimarka populasyonundan elde edilmiş verilerin desteklenmiş

olduğu görülmektedir (Ringold, 2002). Farklı bir çalışmada ise, HT hastalığının MZ ikizlerdeki konkordansını %55 olduğu, ancak DZ ikizlerde, HT hastalığının birlikteliğinin belirlenemediği ifade edilmektedir (Brix, 2000).

OTH gelişiminde, genetik faktörlerin etkisinin güçlü olduğunu gösteren birçok epidemiyolojik verinin ortaya konmasıyla; farklı gruplar tarafından, OTH ile ilişkili duyarlılık genlerinin haritalanması ve tanımlanmasına yönelik çalışmaların yürütülmüş olduğu görülmektedir. Bunun için iki temel strateji kullanıldığı belirtilmektedir: aday genlerin bağlantı ve asosiyasyon analizlerinin de içinde bulunduğu kompleks hastalık genlerinin haritalanması ve tüm genom tarama yöntemleri (Tomer and Davies, 2003). Bunun sonucunda, OTH ile ilişkili olduğu belirlenen MHC genleri, CTLA-4 ve CD40 gibi immün sistemle ilişkili genlerin yanı sıra; TSHR geni, TPO geni ve TG geni gibi tiroid spesifik genler üzerinde de çalışılmış olduğu görülmektedir. İlk olarak, bağlantı analiz yöntemi kullanılarak yürütülmüş bir çalışmada, 8q24 bölgesinde yer alan bir mikrosatellit markır (D8S272) ile OTH arasındaki bağlantıya işaret edildiği görülmektedir (Sakai, 2001). Farklı bir çalışmada TG geni incelenerek; intron 10 (Tgms 1) ve intron 27 (Tgms 2) bölgelerinde, iki yeni mikrosatellit markırın bulunduğu işaret edilmiştir. Bu çalışmada yapılan bağlantı ve asosiyasyon analizleri sonucunda, 8q24 bölgesinde yer alan TG geninin OTH ile ilişkili majör bir duyarlılık geni olduğuna dair güçlü bulgular elde edildiği ifade edilmektedir (Tomer, 2002). TG geninde 48 ekzonun dizi analizinin yapıldığı bir çalışmada, 14 SNP bölgesinin tanımlandığı ve bu bölgelerden ekzon 10, ekzon 12 ve ekzon 33'te yer alan polimorfizmlerin OTH ile ilişkili bulunduğu ifade edilmektedir. (Ban, 2003)

Çalışmamızda, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmleri ile OTH arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; E10SNP24, E10SNP158 ve E21SNP bölgeleri ile OTH arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. E33SNP bölgesindeki genotip dağılımları, OTH grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ( $p:0,038$ ) göstermiştir. E33SNP bölgesinde TT genotipinin OTH grubundaki sıklığının, kontrol grubuna oranla azaldığı görülmüş; CC genotipinin ise

kontrol grubuna göre, OTH grubundaki sıklığında bir artış gözlemlenmiştir. E33SNP bölgesindeki genotip dağılımlarının karşılaştırılması sonucu, OTH açısından, TT genotipini taşımayan bireylerin, TT genotipine sahip bireylere oranla; 2,93 kat daha fazla risk taşıdıkları; bu riskin en az 1,25 ve en fazla 6,86 olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamızda, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmleri ile GH ve HT hastalığının ilişkisi değerlendirilmiştir. E12SNP bölgesi için AA genotipi, kontrol grubunda %12,9 oranında görülürken; GH'nda %24,3, HT'nde ise %21,4 oranında görülmüştür. AG genotipinin, GH'nda (%38,6), HT (%60,0) ve kontrol gruplarından (%57,1) daha düşük bir oranda görüldüğü saptanmıştır. GG genotipi ise, en düşük oranda HT'nde (%18,6) gözlemlenirken; %37,1 oranıyla en sık GH'nda görülmüş; kontrol grubundandaki oranı ise %30,0 olarak belirlenmiştir. Bu gruplar arasında gözlemlenen farklılık istatistiksel açıdan anlamlı (p:0,033) bulunmuştur.

Çalışmamızda, E12SNP bölgesinin, GH ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında; AG genotipini taşımayan bireylerde, AG genotipine sahip bireylere oranla GH gelişme riskinin 2,12 kat daha fazla olduğu; bu riskin, en az 1,08 ve en fazla 4,17 olabileceği görülmektedir. Ayrıca, AG genotipini taşımayan bireylerde, AG genotipine sahip bireylere oranla GH gelişme riskinin, HT hastalığının gelişme riskinden 2,39 kat daha fazla olduğu; bu riskin en az 1,21 ve en fazla 4,71 olabileceği belirlenmiştir. E12SNP bölgesine ilişkin olarak ayrıca, GG genotipine sahip bireylerde, GG genotipini taşımayanlara oranla GH gelişme riskinin HT hastalığının gelişme riskinden 2,59 kat daha fazla olduğu; bu riskin, en az 1,20 ve en fazla 5,61 olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Birleşik Krallık'ta yaşayan beyaz ırk popülasyonunda yapılmış bir çalışmada; TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin OTH ile ilişkisinin araştırıldığı; ancak, incelenen polimorfizmler ile OTH arasında anlamlı bir ilişkinin belirlenemediği ifade edilmektedir (Collins, 2004).

TG gen polimorfizmlerinin OTH ile ilişkisini belirlemek amacıyla, Tunus popülasyonunda, etkilenmiş 15 ailede E10SNP24, E12SNP, E21SNP ve E33SNP bölgelerinin çalışılmış olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ayrıca, TG geni intron 27 intragenik mikrosatellit markırın (Tgms2) incelendiği belirtilmektedir. Sonuç olarak Tunuslular'da, TG'nin OTH'nın kalıtımdaki etkisine dair herhangi bir veri elde edilemediği ifade edilmektedir (Belguit-Maalej, 2007).

Tayvan popülasyonunda, TG geni E158SNP, E12SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin GH ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılmış bir çalışmada, E158SNP ve E12SNP bölgelerinde, GH ile kontrol grubu arasında birbirine benzer sonuçlar elde edildiği; E33SNP TT genotipinin kontrol grubuna kıyasla, GH'nda anlamlı bir artış gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca, E33SNP CC genotipini taşıyan, anti-TSHR pozitifliği belirlenmiş, sigara kullanan ve oftalmopati görülen GH grubunun, antitiroid tedavisi sonrası Graves hipertiroidizmi relaps insidansında anlamlı bir artış görüldüğü ifade edilmiştir (Hasiao, 2007). Aynı popülasyonda, daha sonra yapılmış diğer bir çalışmada ise, E33SNP bölgesindeki TT genotipinin GH için bir duyarlılık faktörü, E12SNP GG genotipinin ise GH'nda koruyucu bir faktör olduğuna işaret edilmiştir (Hasiao, 2008).

Tiroglobulin genine ait; E10SNP24 (T/G), E10SNP158 (T/C), E12SNP (A/G) ve E33SNP (C/T) polimorfizmlerine ilişkin olarak, Çin popülasyonunda, yapılmış bir çalışmada, GH grubu, HT hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında bu dört bölge açısından herhangi bir farklılık bulunmadığı; ayrıca, erkek ve kadınlar arasında da anlamlı bir farklılık belirlenemediği bildirilmektedir (Maierhaba, 2008).

Günümüze kadar, OTH ile ilişkili çok sayıda aday genin belirlendiği ifade edilmektedir (Jacobson and Tomer, 2007). Bunlar arasında, immun yanıtta sorumlu genleri kodlayan ve oldukça polimorfik bir bölge olduğu bilinen HLA lokusunun, OTH'na duyarlılıkta majör bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Tomer and Davies, 2003). GH'na göre, HLA haplotipleriyle HT arasındaki ilişkiyi gösteren çok az veri bulunduğu belirtilmektedir. Bu durumun, GH'na göre HT hastalığının tanısının

nisbeten daha zor olmasından ileri gelebileceği ifade edilmektedir. Çünkü HT'nde, herhangi bir fonksiyonel probleme neden olmaksızın gelişen ve fokal lenfositik infiltrasyonla birlikte görülen tiroid otoantikorlarının sunumu (asemptomatik otoimmün tiroid) görülebildiği gibi; tiroid hasarına neden olan guatr veya atrofik tiroiditin de gelişebileceği ifade edilmektedir (Davies and Amino, 1993).

GH ile HLA allellerinin ilişkisi yönünde, farklı popülasyonlardan elde edilmiş çok sayıda verinin bulunduğu görülmektedir. Bu konuya ilişkin ilk olarak, beyaz ırkta, HLA-B8'in GH ile ilişkili olduğu bulunmuş (Bech, 1977) ve GH ile HLA-B8 ilişkisi için rölatif risk oranının 1,5-3,5 olduğu ifade edilmiştir. (Farid, 1980) Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, HLA-DR3 lokusu ile GH arasında daha güçlü bir ilişki bulunduğu belirlenmiş; ayrıca, HLA-DR3'ün HLA-B8 ile bağlantı dengesizliği gösterdiğine işaret edilmiştir (Farid, 1981). Farklı beyaz ırk popülasyonlarında (Avrupa ve Kuzey Amerika) yapılmış bir çalışmada, GH'nda HLA-DR3 sıklığının genel olarak %40-55, genel popülasyonda ise %15-30 oranında olduğu gösterilmiştir (Volpe, 1990). Bir diğer çalışmada ise, farklı beyaz ırk popülasyonlarında, HLA-DQA1\*0501 allelinin (rölatif risk oranı 3,8) GH ile ilişkili bulunduğu ifade edilmiştir (Yanagawa, 1993; Barlow, 1996; Marga, 2001). Ancak, GH ile ilişkili primer genin HLA-DR3 olduğu belirtilmektedir (Zamani, 2000).

Beyaz ırk dışında kalan popülasyonlardan elde edilmiş verilerde, GH ile HLA ilişkisinin belirlenmiş olduğu; ancak, ilişkili bulunan HLA allellerinin farklı olduğu ifade edilmektedir. Örneğin, Japon popülasyonunda yapılmış çalışmalarla, HLA-BW35 ve HLA-B5 allellerinin GH ile ilişkili bulunduğu belirtilmiştir (Kawa, 1977; Inoue, 1992). Daha sonraki yıllarda, Japon popülasyonunda, GH ile ilişkili farklı HLA allellerinin de belirlendiği görülmektedir (Onuma, 1994; Katsuren, 1994; Ohtsuka and Nakamura, 1998). Çin popülasyonunda yapılmış bir çalışma sonucunda, HLA-Bw46'nın GH ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Yeo PP, 1989). GH ile HLA ilişkisi üzerine yapılmış anlamlı bir çalışmada ise, Afrika kökenli Amerikanlar'da, HLA-DRB3\*0202 sıklığına işaret edilmiştir (Chen, 2000). Farklı etnik grupların bir arada bulunduğu Brezilya'da, HLA-DR3 sıklığına dikkat çekilmektedir. Bu durumda, HLA-DR3'ün beyaz ırk dışındaki popülasyonlarda da görülebileceği; ya da



sonucun, Brezilya'da yaşayanların çoğunluğunun atalarının Avrupalı olmasından ileri gelebileceği ifade edilmektedir (Maciel, 2001).

Toplumumuzda, GH ile HLA ilişkisi üzerine, serolojik HLA tiplendirme yöntemi kullanılarak yapılmış bir çalışmada, Graves hastalarında HLA-DR3 prevalansının kayda değer bir artış gösterdiği; ancak, GH ile HLA-DR3 ilişkisinin, daha önceki bulgulardan daha az güçlü bulunduğu belirtilmektedir (Orhan, 1993). Farklı bir çalışmada, PCR-SSP yöntemi kullanılarak, HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) varlığının GH grubunda %28,24 olarak belirlendiği; kontrol grubunda ise %16,0 olarak bulunduğu belirtilmektedir. Bu veriler ışığında, HLA-DR3 allelinin oftalmopati varlığına bağlı olmaksızın, GH ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Yarman, 2007).

Çalışmamızda, GH grubu ve kontrol grubunda yapmış olduğumuz HLA-DR analizi neticesinde; GH'nda HLA-DR3 varlığı %24,3 olarak belirlenirken; kontrol grubunda ise %18,6 olarak bulunmuştur. GH grubunda, HLA-DR3 sıklığı kontrol grubuna göre daha yüksek oranda belirlenmiş; bu değerler Yarman ve ark. tarafından yapılan çalışmada belirtilen değerlere yakın bulunmuştur. Ancak, HLA-DR3 allel sıklığı için, iki grup arasında görülen farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (p: 0,410).

HLA Sınıf II moleküllerinin, oldukça polimorfik bir yapı gösterdiği bilinmekte; sadece HLA-DR3 bölgesinin, farklı sekans varyantları olarak 25'ten fazla alt gruba sahip olduğu ifade edilmektedir. Yakın bir döneme kadar, DRb1 zincirindeki, GH'na duyarlılıkta rolü olan amino asit sekansının bilinmediği; ancak, HLA-DRB1 ve HLA-DQ bölgelerinde yer alan spesifik amino asit sekanslarının, Tip I IDDM gibi diğer otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğunu gösteren kanıtların olduğu ifade edilmektedir (Todd, 1987; Jacobson, 2008). Önemli bir çalışmada, GH ile kontrol grubunda HLA-DRB1 lokusunun sekans analizini yapılmış; GH'na duyarlılıkta kritik bir DR amino asiti olan, DRb1 zincirinin 74. pozisyonunda bir arjinin rezidüsünü (DRb1-Arg74) tanımlamıştır (Ban, 2004a). Bu önemli çalışmanın,

Simmonds ve ark. tarafından tekrarlanmış olduğu görülmektedir (Simmonds, 2005). DRb1 zincirinin 74. pozisyonunda, arjinin dışında, sıklıkla görülen diğer amino asitlerin, alanin ve glutamin olduğu; bu sebeple, BRb1-Ala74 ve DRb1-Glu74 varlığının, teorik olarak GH'na karşı koruyucu etki gösterebileceği ifade edilmektedir (Jacobson, 2008). Farklı bir çalışmada, 74. pozisyondaki Glutamin varlığının GH için koruyucu olduğu gösterilmiştir (Ban, 2004a). Bundan yola çıkarak, DRb1 zincirindeki 74. pozisyonunun, GH için kritik bir patoetiyojolojiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Jacobson, 2008).

HLA allelleri arasında, otoantijenlerdeki peptitlere bağlanma afiniteleri açısından farklılık bulunduğu; bu durumun, otoimmün hastalıklara karşı duyarlılıkta, HLA moleküllerinin rolünü açıklayabileceği belirtilmektedir. (Buus, 1987) Bunun bir örneği olarak, tiroidal bir otoantijen olarak kabul edilen Tg molekülü ile HLA-DR3 ilişkisi gösterilmektedir (Jacobson, 2008). Ban ve ark. tarafından yapılan çalışmada, TG genindeki SNP bölgeleri ile HLA-DR3 interaksiyon analizi yapılmış; GH'nda E33SNP CC genotipi ile HLA-DR3 ilişkisine (TRR değeri 6,1) işaret edilmiştir (Ban, 2003). Başka bir çalışmada ise, bir TG varyantı ile DRb1-Arg74 interaksiyonunun GH gelişimini artırdığı ifade edilmiştir (Hodge, 2006).

Çalışmamızda, HLA-DR3 allelini taşıyan GH grubu ve kontrol grubunda, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E33SNP polimorfizmleri değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ban ve ark. (2003) çalışmalarında, E33SNP CC genotipinin HLA-DR3 ile birlikteliğinde gözlemlenen, GH'ndaki risk oranı artışına işaret etmektedirler. Collins ve ark. (2004) ise çalışmalarında, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP ve E33SNP polimorfizmleriyle HLA-DR3 arasında, hastalık riskini etkileyen bir etkileşiminin bulunmadığını belirtmektedir.

OTH ile ilişkili olarak belirlenmiş ilk duyarlılık genlerinin HLA-DR lokusunda bulunduğu; GH'nda TSHR'ne karşı, HLA Sınıf II ilişkili otoantikor yanıtının primer etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Ancak, yapılan bir çalışmada, Sınıf I grubunda yer alan HLA-C genlerinin GH ile ilişkisinin, HLA-DRB1 ilişkisinden daha güçlü olduğu ifade edilmektedir (Simmonds, 2007).

## 5. SONUÇ

Çalışmamızda, E33SNP TT genotipinin OTH tanısı olan hastalarda, tiroid hastalıkları yönünden sağlıklı bireylere oranla daha nadir görüldüğü; TT genotipi taşımayan bireylerde, TT genotipine sahip bireylere oranla OTH riskinin arttığı görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada ayrıca, E12SNP AG genotipinin HT hastaları ve tiroid hastalıkları yönünden sağlıklı bireylere oranla GH tanısı almış bireylerde daha nadir görüldüğü belirlenmiştir. HT hastaları ve tiroid hastalıkları görülmeyen sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, GH gelişme riskinin, AG genotipini taşımayan bireylerde, AG genotipine sahip bireylere oranla artış gösterdiği görülmektedir. GG genotipine sahip bireylerde ise, GG genotipi taşımayan bireylere oranla GH riskinin HT riskinden daha yüksek olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızda, HLA-DR3 allelinin görülme sıklığı açısından GH tanısı olan bireyler ile sağlıklı kontroller arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamış; TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin HLA-DR3 birlikteliğinde GH ile anlamlı bir ilişkisi belirlenememiştir.

Çalışmamızın sonucunda, E33SNP TT genotipini taşımayan bireylerde OTH riskinin arttığı belirlenmiştir. E12SNP AG genotipini taşımayan bireylerde ise GH riskinin arttığı ve bu bireylerde GH riskinin HT hastalığı riskinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca E12SNP GG genotipine sahip bireylerde de GH riskinin, HT hastalığından daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, toplumumuzda OTH ile TG gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması ve GH'nda bu allelik varyantlarla HLA-DR3 ilişkisinin belirlenmesi yönünde yürütülmüş ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz bulgulara

göre, E33SNP TT genotipinin OTH ile, E12SNP AG genotipinin GH ile ilişkili olduğu; E12SNP AG ve E12SNP GG genotiplerinin ise GH ile HT hastalığı risk oranlarının değerlendirilmesinde önem taşıdıkları görülmektedir. Bu durumda, E33SNP ve E12SNP polimorfizmlerinin toplumumuzdaki dağılımının, daha geniş kapsamlı populasyon çalışmalarıyla incelenmesinin faydalı olacağını düşünülmektedir. Son olarak, GH'na ilişkin son yıllarda yapılmış yeni çalışmalar dikkate alınarak, toplumumuzda HLA-DR3 ile TG varyantları arasındaki ilişkinin araştırılmasında, HLA-DR molekülü amino asit dizisindeki farklılıklarının incelenmesinin faydalı olacağını düşünmekte ve GH ile daha yakın ilişkili olduğu ifade edilen HLA-C genlerinin toplumumuzdaki genel dağılımının araştırılmasının önemini vurgulamaktayız.

## ÖZET

### **Otoimmün Tiroid Hastalıklarında Tiroglobulin Gen Polimorfizmi ve HLA-DR3 ile Yaygın Tiroglobulin Varyantları Arasındaki İlişkinin Saptanması**

Otoimmün Tiroid Hastalıkları (OTH), genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu gelişen kompleks bir hastalık grubudur ve günümüze kadar, farklı teknikler kullanılarak, OTH ile ilişkili duyarlılık genleri tanımlanmıştır. İnsan lökosit antijenlerini (HLA) kodlayan genlerin, diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, OTH ile ilişkili olduğu bilinmekte ve özellikle Graves hastalığında (GH) HLA-DR3 sıklığına işaret edilmektedir. Tiroid spesifik genlerle ilişkili olarak ise, 8q24 lokusunda yer alan tiroglobulin (TG) geninin, OTH ile ilişkili bulunan tek tiroid spesifik gen olduğu ifade edilmektedir.

Çalışmamızda, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin, PCR-RFLP tekniği kullanılarak, GH, Haşimato tiroiditi (HT) ve sağlıklı kontrollerdeki dağılımı incelenmiş; GH ve kontrol gruplarında, PCR-SSP yöntemiyle HLA-DR3 varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızda ayrıca, TG geni E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmleri ile HLA-DR3 ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda, E33SNP TT genotipini taşımayan bireylerde OTH riskinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, E12SNP AG genotipini taşımayan bireylerde GH riskinin arttığı; E12SNP AG genotipini taşımayan bireyler ve E12SNP GG genotipine sahip bireylerin GH riskinin, HT hastalığı riskinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak, E12SNP24, E12SNP158 ve E21SNP polimorfimleri ile OTH arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda, HLA-DR3 ile E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP ve E33SNP polimorfizmlerinin birlikteliğinin GH'ndaki etkisine ilişkin anlamlı bir bulguya ulaşılamamıştır.

Sonuç olarak toplumumuzda, E33SNP TT genotipinin OTH ile ilişkili olduğu, E12SNP AG genotipinin GH ile ilişkili olduğu ve E12SNP AG ve E12SNP GG genotiplerinin GH ile HT hastalığı risk oranlarının değerlendirilmesinde önem taşıdıkları görülmektedir. Ancak, TG gen polimorfizmleri ile HLA-DR3 birlikteliğinin GH ile ilişkisi hakkında, daha kapsamlı ve ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Otoimmün tiroid hastalıkları, Graves hastalığı, Haşimato tiroiditi, Tiroglobulin, HLA-DR3, PCR-RFLP, PCR-SSP

## SUMMARY

### **Thyroglobuline Gene Polymorphisms in Autoimmune Thyroid Diseases and Detection of the Association between HLA-DR3 and Common Thyroglobuline Variants**

Autoimmune thyroid disease (AITD) are a group of complex diseases which are caused by the interaction between genetic and environmental factors and up to the present, susceptibility genes responsible to development AITD are identified by using various techniques. As can be seen other autoimmune diseases, it is known that the association between genes that are coding Human Leukocyte Antigens (HLA) and AITD and especially it is indicated the frequency of HLA-DR3 in Graves' disease (GD). Relating to thyroid specific genes, it is implied that, thyroglobulin (TG) gene that is located 8q24 locus is the first gene for AITD.

In our study, we investigated the distributions of E10SNP24, E10SNP158, E21SNP, E12SNP and E33SNP polymorphisms that are located in the TG gene in GD, Hashimoto thyroiditis (HT) and healthy controls by using PCR-RFLP technique. We also determined the existence of HLA-DR3 in GD and healthy control groups by using PCR-SSP method and researched the association between E10SNP24, E10SNP158, E21SNP, E12SNP and E33SNP polymorphisms of TG gene and HLA-DR3.

In accordance with the results, we found that, the risk in the development of AITD was increased in individuals who were not carrier of E33SNP TT genotype. It is also found that, the risk in the development of GD was increased in individuals who were not carrier of E12SNP AG genotype. The risk ratio of the development of GD was found higher than HT in individuals who were not carrier E12SNP AG genotype and individuals who were carrier of E12SNP GG genotype. However, there was no evidence in the association between E10SNP24, E10SNP158, E21SNP polymorphisms and AITD. We couldn't observed any significant result about the



effect of E10SNP24, E10SNP158, E12SNP, E21SNP and E33SNP polymorphisms in combination with HLA-DR, in the development of GD.

As the result of this study, we concluded that E33SNP TT genotype is associated with AITD, E12SNP AG genotype is associated with GD and E12SNP AG and GG genotype are important in the comparison of the risk ratio of GD and HT. However, more extensive and advanced studies are needed about the association between GD and polymorphisms of TG gene in combination with HLA-DR3.

**Key words:** Autoimmune thyroid diseases, Graves' disease, Hashimoto tiroiditis, Thyroglobulin, HLA-DR3, PCR-RFLP, PCR-SSP

## KAYNAKLAR

- AKAMIZU T., SALE M.M., RICH S.S., HIRATANI H., NOH J.Y., KANAMOTO N., SAJO M., MIYAMOTO Y., SAITO Y., NAKAO K., BOWDEN D.W. (2000). Association of autoimmune thyroid disease with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in Japanese patients. *Thyroid*, 10:851-858.
- ANTONELLI A., FERRI C., PAMPANA A., FALLAHI P., NESTI C., PASQUINI M., MARCHI S., FERRANNINI E. (2004). Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med*, 117(1):10-3
- ATA E. (1999). Tiroid Hastalıklarının Epidemiyolojisi Tiroid hastalıkları ve Nöropsikiyatrik Açılımları Kitabı, Bölüm 5, pg: 75-83; Melisa Matbaacılık, İstanbul
- AYADI H., HADJ KACEM H., REBAI A., FARID N.R. (2004). The genetics of autoimmune thyroid diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15:234
- BADENHOOP K., SCHWARTZ G., WALFISH P.G., DRUMMOND V., USADEL K. H., BOTTAZZO G. F. (1990) Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*, 71:1131-1137.
- BAN Y., DAVIES T.F., GREENBERG D.A., CONCEPCION E.S., TOMER Y. (2002a). The influence of human leucocyte antigen (HLA) genes on autoimmune thyroid disease (AITD): results of studies in HLA-DR3 positive AITD families. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 57(1), 81-8.
- BAN Y., GREENBERG D.A., CONCEPCION E.S., TOMER Y. (2002b). A germline single nucleotide polymorphism at the intracellular domain of the human thyrotropin receptor does not have a major effect on the development of Graves' disease. *Thyroid*, 12, 1079-1083.
- BAN Y., GREENBERG D.A., CONCEPCION E., SKRABANEK L., VILLANUEVA R., TOMER Y. (2003). Amino acid substitutions in the human thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 100(25):15119-24
- BAN Y., DAVIES T.F., GREENBERG D.A., CONCEPCION E.S., OSMAN R., OASHI T., TOMER Y. (2004a). Arginine at position 74 of the HLA-DRb1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun*, 5:203-208.
- BAN Y, TOZAKI T, TANIYAMA M, TOMITA M., BAN Y. (2004b). Association of Thyroglobulin Polymorphisms with Hashimoto's Thyroiditis in The Japanese Population. *Clinical Endocrinology*, 61; 263-268
- BAN Y, TOMER Y. (2005) Susceptibility genes in thyroid autoimmunity. *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1):47-58.
- BARLOW A.B.T., WHEATCROFT N., WATSON P., WEETMAN A.P. (1996). Association of HLA-DQA1\*0501 with Graves' disease in English Caucasian men and women. *Clin Endocrinol*, 44:73-77.

- BECH K., LUMHOLTZ B., NERUP J., THOMSEN M., PLATZ P., RYDER L.P., SVEJGAARD A., SÆRSBÆK-NIELSEN K., HANSEN J.M., LARSEN J.H. (1977). HLA antigens in Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 86:510-516.
- BELGUÏT-MAALEJ S., HADJ KAJEM H., REBAÏ A., MNÏF M., ABÏD M., AYADÏ H. (2007). Thyroglobulin polymorphisms in Tunisian patients with autoimmune thyroid diseases (AITD). *Immunobiol*, 213: 577-83.
- BOTTINÌ N., MUSUMECÌ L., ALONSO A., RAHMOUNÌ S., NÌKA K., ROSTAMKHANÌ M., MACMURRAY J., MELONÌ G.F., LUCARELLÌ P., PELLECCHÌA M., EISENBARTH G.S., COMINGS D., MUSTELÌN T. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*, 36:337-338.
- BRÌX T.H., KYVÌK K.O., HEGEDUS L. (2000) A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*: 85: 536-39.
- BRÌX T.H., KYVÌK K.O., CHRÌSTENSEN K., HEGEDUS L. (2001). Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*., 86: 930-934.
- BROWN R.S. (2009) Autoimmune Thyroid Disease: Unlucked a Complex Puzzle. *Current Opinion in Pediatrics*, 21: 523-528.
- BROWNLIE B.E., WELSH J.D. (1990) The Epidemiology of Thyrotoxicosis in New Zealand: Incidence and Geographical Distribution in North Catebury, 1883-1985. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 23: 249-259.
- BUUS S., SETTE A., GREY H.M. (1987) The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. *Immunol Rev*, 98:115-141.
- BÜLOW PEDERSEN I.B., KNUDSEN N., JØRGENSEN T, PERRILD H., OVESEN L., LAURBERG P. (2003) Thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in a large survey of populations with mild and moderate iodine deficiency. *Clinical Endocrinology*, 58: 36-42.
- CANARIS G.J., MANOWITZ N.R., MAYOR G., RIDGWAY C. (2000) The Colorado Thyroid Disease Prevalance Study. *Arch Intern Med*, 160: 526-534.
- CANNING M.O., RUWHOF C., DREXHAGE H.A. (2003) Aberrancies in antigen-presenting cells and T cells in autoimmune thyroid disease. A role in faulty tolerance induction. *Autoimmunity*, 36: 429-442.
- CATUREGLÌ P., KÌMURA H., ROCCHÌ R., ROSE N.R. (2007) Autoimmune thyroid diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 19: 44-48.
- CHANG C.C., CAMPOLÌ M., FERRONE S. (2004) HLA class I antigen expression in malignant cells: why does it not always correlate with CTL-mediated lysis. *Current Opinion in Immunology*, 16:644-650.

- CHEN Q.Y., NADELL D., ZHANG X.Y., KUKREJA A., HUANG Y.J., WISE J., SVEC F., RICHARDS R., FRIDAY K.E., VARGAS A., GOMEZ R., CHALEW S., LAN M.S., TOMER Y., MACLAREN N.K. (2000). The human leukocyte antigen HLA DRB3\*020/DQA1\*0501 haplotype is associated with Graves' disease in African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:1545–1549.
- CHİSTIAKOV D.A., SAVOST'ANOV K.V., TURAKULOV R.I., PETUNINA N., BALABOLKİN MI, NOSIKOV VV. (2002). Further studies of genetic susceptibility to Graves' disease in a Russian population. *Med Sci Monit*, 8:180–184.
- COLLINS J.E., HEWARD J.M., CARR-SMITH J., FRANKLYN J.A., GOUGH S.C.L.(2004). Common allelic variants of exon 10, 12 and 33 of human thyroglobulin gene are not associated with autoimmune thyroid disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:6336-9.
- COYLE A.J., LEHAR S., LLOYD C., TIAN J., DELANEY T., MANNING S., NGUYEN T., BURWELL T., SCHNEIDER H., GONZALO J.A., GOSSELIN M., OWEN L.R., RUDD C.E., GUTIERREZ-RAMOS J.C. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*, 13:95–105.
- DAVIES T.F., AMINO N. (1993) A new classification for human autoimmune thyroid disease. *Thyroid*, 3(4):331-333.
- DAVLA K., BEKSAÇ M. (1999) Doku uygunluk antijenleri. Ed. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Pg: 133-136. Güneş Kitapevi. Ankara.
- DE ROUX N., SHIELDS D.C., MISRAHI M., RATANACHAIYAVONG S., MCGREGOR A.M., MILGROM E. (1996). Analysis of the thyrotropin receptor as a candidate gene in familial Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81:3483–3486.
- EFE B. (1996). Otoimmün Tiroid Hastalıklarında Otoimmünite ve Antikardiyolipin Antikorları. İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. İç Hast. AD Endokrinoloji-Metabolizma ve Beslenme BD Yan Dal Uzmanlık Tezi.
- FARİD N.R., STONE E., JOHNSON G. (1980). Graves' disease and HLA: clinical and epidemiologic associations. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 13:535-544.
- FARİD N.R. (1981). Graves' Disease In: Farid NR , Editor. HLA in Endocrine and Metabolic Disorders. London: Academic Pres. p. 85-143.
- FARİD N.R., SAMPSON L., MOENS H., BARNARD J.M. (1981). The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5. *Tissue Antigens*, 17: 265–268.
- GRAAF S.A.R., RİS-STALPERS C., PAUWS E., MENDİVE F.M., TARGOVNİK H.M., DE VİJLDER J.J. (2001) Up to date with human thyroglobulin. *Journal of Endocrinology*, 170:307-321.

- GU L.Q., ZHU W., ZHAO S.X., ZHAO L., ZHANG M.J., CUI B., SONG H.D., NING G., ZHAO Y.J. (2010) Clinical associations of the genetic variants of CTLA-4, Tg, TSHR, PTPN22, PTPN12 and FCRL3 in patients with Graves' disease. *Clin Endocrinol*, 72(2): 248-255
- HADJ-KAJEM H., REBUFFAT S., MNİF-FÉKİ M., BELGUİTH-MAALEJ S., AYADİ H., PÉRALDİ-ROUX S. (2009). Autoimmune thyroid diseases: genetic susceptibility of thyroid specific genes and thyroid autoantigens contribution. *International Journal of Immunogenetics*, (36): 85-96.
- HALL R., STANBURY J.B. (1967) Familial studies of autoimmune thyroiditis. *Clin Exp Immunol*, 2:719-725.
- HASİAO J.Y., HASİEH M.C., TİEN K.J., HSU S.C., SHİN S.J., LİN S.R.(2007). Association between a C/T polymorphism in exon 33of the thyroglobulin gene is associated with relapse of Graves' hyperthyroidism after antithyroid withdrawal in Taiwanese. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(8):3197-3201.
- HASİAO J.Y., HASİEH M.C., TİEN K.J., HSU S.C., LİN S.R., KE D.S. (2008). Exon 33 T/T genotype of the thyroglobulin gene is a susceptibility gene for Graves' disease in Taiwanese and exon 12 G/G genotype protects against it. *Clin Exp Med*, 8: 17-21.
- HEWARD J.M., ALLAHABADİA A., DAYKİN J., CARR-SMİTH J., DALY A., ARMİTAGE M., DODSON P.M., SHEPPARD M.C., BARNETT A.H., FRANKLYN J.A., GOUGH S.C.L. (1998) Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83: 3394–3397.
- HOFBAUER L.C., MÜHLBERG T., KÖNİG A., HEUFELDER G., SCHWORM H.D., HEUFELDER A.E. (1997). Soluble interleukin-1 receptor antagonist serum levels in smokers and nonsmokers with Graves' ophthalmopathy undergoing orbital radiotherapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 2244–2247.
- HODGE S.E., BAN Y., STRUG L.J., GREENBERG D.A., DAVİES T.F., CONCEPCİON E.S., VİLLANUEVA R., TOMER Y. (2006). Possible Interaction Between HLA-DRbeta1 and Thyroglobulin Variants in Graves' Disease. *Thyroid*, 16(4):351–355.
- INOUE D., SATO K., ENOMOTO T., SUGAWA H., MAEDA M., INOKO H., TSUJİ K., MORİ T., IMURA H. (1992). Correlation of HLA types and clinical findings in Japanese patients with hyperthyroid Graves' disease: evidence indicating the existence of four subpopulations. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 36:75–82.
- İMİR T. (1999). Antijen. Ed. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. Pg: 127-132. Güneş Kitapevi. Ankara.
- JACOBSON D.L., GANGE S.J., ROSE N.R., GRAHAM N.M. (1997). Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*, 84: 223-243.

- JACOBSON E.M., TOMER Y. (2007). The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. *J Autoimmun*, 28: 85–98.
- JACOBSON E.M., HUBER A., TOMER Y. (2008). The HLA gene complex in  
From epidemiology to etiology. *Journal of Autoimmunity*, 30:58-62.
- JAUME J.C., GUO J., PAULS D.L., ZAKARIJA M., MCKENZIE M.J., EGELAND J.A., BUREK C.L., ROSE N.R., HOFFMAN W.H., RAPOPORT B., MCLACHLAN S.M. (1999). Evidence for genetic transmission of thyroid peroxidase autoantibody epitopic “fingerprints.” *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1424-1431.
- JENKINS D., PENNY M.A., FLETCHER J.A., JACOBS K.H., MIJOVIC C.H., J.A., SHEPPARD M.C. (1992) HLA class II gene polymorphism contributes little to Hashimoto’s thyroiditis. *Clinical Endocrinology*, 37(2): 141–145.
- KARNATH B.M., HUSSAİN N. (2006). Signs and Septoms of Thyroid Dysfunction. *Hospital Physician*, 43-48.
- KATSUREN E., AWATA T., MATSUMOTO C.,YAMAMOTO K. (1994). HLA class II alleles in Japanese patients with Graves’ disease: weak associations of HLA-DR and -DQ. *Endocr J*, 41:599–603.
- KAWA A., NAKAMURA S., NAKAZAWA M., SAKAGUCHI S., KAWABATA T KAWABATA T., MAEDA Y., KANEHISA T. (1977). HLA-BW35 and B5 in Japanese patients with Graves’ disease. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 86 (4):754–757.
- KLECHA A.J., ARCOS M.L.B., FRÍCK L., GENARO A.M., CREMASCHÍ G. (2008). İmmune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation*, 15:68-75.
- KOLOĞLU S. (1996). Tiroid-Genel Görüşler. Ed. Koloğlu S. *Temel ve klinik Endokrinoloji Kitabı*, 1. baskı, Nobel Kitabevi, Ankara, p:135-158.
- LAURBERG P., PEDERSEN K.M., VESTERGAARD H., SÍGURDSSON G. (1991). High incidence of multinodular toxic goitre in the elderly population in a low iodine intake area vs. high incidence of Graves’ disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland. *Journal of Internal Medicine*, 229: 415–420.
- LAURBERG P., PEDERSEN K.M., HREİÐARSSON A., SÍGFUSSON N., IVERSEN E., KNUDSEN P.R. (1998). Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(3): 765–769.
- LAURBERG P., NØHR S.B., PEDERSEN K.M., HREİÐARSSON A.B., ANDERSEN S BÜLOW PEDERSEN I., KNUDSEN N, PERRILD H., JØRGENSEN T., OVESEN L. (2000). Thyroid disorders in mild iodine deficiency. *Thyroid*, 10: 951–963.

- MACÍEL L.M., RODRÍGUES S.S., DİBBERN R.S., NAVARRO P.A., DONADİE.A. (2001). Association of the HLA-DRB1\*0301 and HLA-DQA1\*0501 alleles with Graves' disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. *Thyroid*, 11 (1):31–35.
- MANGKLABRUKS, A., COX, N., DEGROOT L.J. (1991). Genetic factors in autoimmune thyroid disease analyzed by restriction fragment length polymorphisms of candidate genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(2): 236–244.
- MARGA M., DENİSOVA A., SOCHNEV A., PIRAGS V., FARID N.R. (2001). Two HLA DRB 1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves disease: Relevance of cross-population studies. *AmJ Med Genet*, 102(2):188–191.
- MATOS-SANTOS A., NOBRE E.L., COSTA J.G., NOGUEİRA P.J., MACEDO A., GALVÃO-TELES A., DE CASTRO J.J. (2001) Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves' disease and toxic nodular goitre. *Clinical Endocrinology*, 55 (1):15–19.
- MAİERHABA M., ZHANG J.A., YU Z.Y., WANG Y., XİAO W.X., QUAN Y., DONG B.N. (2008) Association of thyroglobuline gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in Chinese population. *Endocrine*, 33(3): 294-9.
- MCGROGAN A., SEAMAN E.H., WRİGHT J.W., VRİES C.S. (2008). The incidence of autoimmune thyroid disease: a systemic review of the literature. *Clinical Endocrinology*, 69: 687-696.
- MEIJERINK P.H.S., YANAKIEV P., ZORN I., GRIERSON A.J., BIKKER H., DYE D., KALAYDJIEVA L., BAAS F. (1998) The gene for the human Src-like adaptor protein (hSLAP) is located within the 64-Kb intron of the thyroglobulin gene. *Eur J Biochem*, 254 (2): 297-303.
- MOENS H., FARİD N.R., SAMPSON L., NOEL E.P., BERNARD J.M. (1978). Hashimoto's thyroiditis is associated with HLA-DRw3. *N Engl J Med*, 299:133–4.
- NELSON J.L., HANSEN J.A. (1990). Autoimmune disease and HLA. *CRC Crit Rev Immunol*, 10:307-28.
- NISHIMURA Y., ITO H., FUJII S., TABATA H., TOKANO Y., CHEN Y.Z., MATSUDA I., MITSUYA H., KIRA J. HASHIMOTO H., SENJU S., MATSUSHITA S. (2001). Molecular and cellular analyses of HLA class II associated susceptibility to autoimmune diseases in the Japanese population. *Mod Rheumatol*, 11:103–112.
- OHTSUKA K., NAKAMURA Y. (1998). Human leukocyte antigens associated with hyperthyroid Graves ophthalmology in Japanese patients. *Am J Ophthalmol*, 126:805–810.
- ONUMA H., OTA M., SUGENOYA A., HİDETOSHİ I. (1994). Association of HLA-DPB1\*0501 with early-onset Graves' disease in Japanese. *Hum Immunol*, 39(3):195–201.
- ORGİAZZİ J. (2000). Anti-TSH receptor antibodies in clinical practice. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 29: 339–355.

- ORHAN Y., AZEGLİ A., CARİN M., ARAL F., SENCER E., MOLVALILAR S. (1993). Human lymphocyte antigens (HLA) and Graves' disease in Turkey. *J Clin Immunol*, 13(5): 339-43.
- PARK Y.J., CHUNG H.K., PARK D.J., KİM W.B., KİM S.W., KOH J.J., CHO B.Y. (2000). Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid*, 10:453-459.
- PETERS A.L., PLENGE R.M., GRAHAM R.R., ALTSHULER D.M., MOSER K.L., GAFFNEY P.M., BISHOP G.A. (2008) A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function. *Blood*, 112(5): 1863-1871.
- PHENEKOS C., VRYONİDOU A., GRITZAPİS A.D., BAXEVANİS C.N., GOULA M., PAPAMİCHAİL M. (2004). Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11: 209–213.
- PIRRO M.T., FILIPPIS V.D., CERBO A.D., SCILLITANI A., LIUZZI A., TASSI V. (1995) Thyroperoxidase microsatellite polymorphism in thyroid disease. *Thyroid*, 5:461–464.
- PRUMMEL M.F., STRİEDER D., WİERSİNGA W.M. (2004). The Enviroment and Autoimmune Thyroid Diseases. *European Journal of Endocrinology*, 150: 605-618.
- RİNGOLD D.A., NİCOLOFF J.T., KESLER M., DAVIS H., HAMILTON A., MACK T. (2002). Further evidence for a strong genetic influence on the development of autoimmune thyroid disease: the California twin study. *Thyroid*, 12 (8): 647-53.
- RİVOLTA C.M., TARGOVNİK H.M. (2006). Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clinica Chimica Acta*, 374: 8-24.
- RUULS S.R., SEDGWİCK J.D. (1999) Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am. J. Hum. Genet*, 65:294-301.
- SAKAİ K., SHİRASAWA S., ISHİKAWA N., ITO K., TAMAI H., KUMA K., AKAMIZU T., TANIMURA M., FURUGAKI K., YAMAMOTO K., SASAZUKI T. (2001). Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum. Mol. Genet*, 10(3): 1379–1386.
- SHANKARKUMAR U. (2004). The human leukocyte antigen (HLA) system. *Int J Hum Genet*, 4(2): 91-103.



- SIMMONDS M.J., HOWSON J.M., HEWARD J.M., CORDELL H.J., FOXALL H., CARR-SMITH J., GIBSON S.M., WALKER N., TOMER Y., FRANKLYN J.A., TODD J.A., GOUGH S.C. (2005) Regression Mapping of Association between the Human Leukocyte Antigen Region and Graves Disease. *Am J Hum Genet*, 76(1):157–163.
- SIMMONDS M.J., HOWSON J.M.M., HEWARD J.M., CARR-SMITH J., FRANKLYN J.A., TODD J.A., GOUGHS.C.L. (2007). A novel and major association of HLA-C in Graves' disease that eclipses the classical HLA-DRB1 effect. *Human Molecular Genetics*, 16 (18): 2149–2153.
- SMYTH D., COOPER J.D., COLLINS J.E., HEWARD J.M., FRANKLYN J.A., HOWSON J.M.M., VELLA A., NUTLAND S., RANCE H.E., MAIER L., BARRATT B.J., GUJA C., IONESCU-TIRGOVISTE C., SAVAGE D.A., DUNGER D.B., WIDMER. (2004). Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, 53:3020-3023.
- STAGNARO-GREEN A., ROMAN S.H., COBÎN R.H., EL-HARAZY E., WALLENSTEÎN S, DAVÎES TF. (1992). A prospective study of lymphocyte-initiated immunosuppression in normal pregnancy: evidence of a T-cell etiology for postpartum thyroid dysfunction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74: 645–653.
- ŞAHİN M., TÛTÛNCÛ N.B., ERDOĞAN M.F. (2008). Graves hastalığında etiopatogenez. *Endokrinolojide Diyalog*, 5:40-47.
- TANDON N., ZHANG L., WEETMAN A.P. (1991) HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 34: 383–6.
- TODD J.A., BELL J.I., MCDEVITT H.O. (1987) HLA-DQbeta gene contributes to and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329:599–604.
- TOMER, Y. (1997) Anti-thyroglobulin autoantibodies in autoimmune thyroid diseases: cross-reactive or pathogenic. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 82: 3–11.
- TOMER, Y., GREENBERG, D.A., DAVÎES T.F. (1999) The genetic susceptibility to type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus and autoimmune thyroid diseases: From epidemiological observations to gene mapping. In: *Contemporary Endocrinology: Autoimmune Endocrinopathies* (ed. R. Volpe), pp. 57–90. Humana Press, Totowa, NJ.
- TOMER Y., DAVID A., GREENBERG., CONCEPCIÓN E., BAN Y., DAVÎES T.F. (2002). Thyroglobulin is a thyroid specific gene for familial autoimmune diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(1):404-7.
- TOMER Y., BAN Y., CONCEPCIÓN E., BARBESÎNO G., VILLANUEVA R., GREENBERG D.A., DAVÎES D.A. (2003a). Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: Results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *Am. J. Hum. Genet.*, 73: 736–747.

- TOMER Y., DAVIES T.F. (2003b). Searching for the Autoimmune Thyroid Disease Susceptibility Genes From Gene Mapping to Gene Function. *Endocrine Reviews*, 24 (5): 694-717.
- TOMER Y., GREENBERG G. (2004). The Thyroglobulin Gene The First Thyroid Specific Susceptibility Gene in Autoimmune Thyroid Disease. *TRENDS in Molecular Medicine*, 10(7): 306-308.
- TOMER Y., HUBER A. (2009). The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*; 32: 231–239.
- TONACCHERA M., PINCHERA A. (2000). Thyrotropin receptor polymorphisms and thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2637-9.
- TUNBRIDGE W.M., CALDWELL G. (1991) The epidemiology of thyroid diseases. In: L.E. Braverman RD Utiger eds. *The Thyroid A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott, Philadelphia.
- URGANCIOĞLU İ., HATEMİ H., YENİCİ O., USLU İ., KAYA H., BENLİ M., VURAL M. (1988). Metin: Türkiye’de endemik guatr taraması. Türkiye’de endemik guatr. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, yayın no:14, pg: 9-40, Emek Matbaası, İstanbul.
- VALTONEN VV, RUUTU P, VARIS K, RANKI M, MALKAMAKI M, MAKELA PH. (1986). Serological evidence for the role of bacterial infections in the pathogenesis of thyroid diseases. *Acta Med Scand*, 219:105–11.
- VANDERPUMP M.P.J., TUNBRIDGE W.M.G., FRENCH J.W., APPLETON D., BATES D., CLARK F., GRIMLEY EVANS J., HASAN D. M., RODGERS H., TUNBRIDGE F., YOUNG E.T. (1995). The incidence of thyroid disorders in the community : a twenty- year follow-up of theWhickham Survey. *Clinical Endocrinology*, 43(1): 55-68.
- VANDERPUMP M.P.J., TUNBRIDGE W.M.G. (1996). The epidemiology of thyroid diseases. In: L.E. Braverman RD Utiger eds. *The Thyroid* Lippincott, Philadelphia.
- VANDERPUMP M.P., TUNBRIDGE F. (2002). Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid*, 12: 839-847.
- VILLANUEVA R., INZERILLO A.M., TOMER Y., BARBESINO G., MELTZER M., CONCEPCION E.S., GREENBERG D.A., MACLAREN N., SUN Z.S., ZHANG D.M., TUCCI S., DAVIES T.F. (2000). Limited genetic susceptibility to severe Graves’ ophthalmopathy: no role for CTLA-4 and evidence for an environmental etiology. *Thyroid*, 10 (9): 791-98.
- VOLPE R. 1990 Immunology of human thyroid disease. In: Volpe R, ed. *Autoimmunity in endocrine disease*. Boca Raton, FL: CRC Press; 73.
- WEETMAN A.P. (2003). Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *European Journal of Endocrinology*, 148: 1–9.

- WEETMAN A.P. (2004). Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 61: 405–413.
- WIERSINGA W.M. (1995). Subclinical hypothyroidism and hyperthyroidism. I. Prevalence and clinical relevance. *Netherlands Journal of Medicine*, 46:197-204.
- YANAGAWA T., MANGKLABRUKS A., CHANG Y.B., OKAMOTO Y., FISFALEN M.E., CURRAN P.G., DEGROOT L.J. (1993). Human histocompatibility leukocyte antigen DQA1\*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:1569–1574.
- YANAGAWA T., HIDAHA Y., GUIMARAES V., SOLIMAN M., DEGROOT L.J. (1995). CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:41-45.
- YANAGAWA T., TANIYAMA M., ENOMOTO S., GOMI K., MARUYAMA H., BAN Y., SARUTA T. (1997). CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid*, 7(6):843-846.
- YARMAN S., OGUZ P., CARIN M. (2007). HLA-DRB1\*03 is a susceptibility gene in patients with Graves' disease with and without ophthalmopathy. *J Immunogen*, 34:23-25.
- YEO P.P.B., CHAN S.H., THAI A.C., NG W.Y., LUI K.F., WEE G.B., TAN S.H., LEE B.W., WONG H.B., CHEAH J.S. (1989). HLA Bw46 and DR9 associations in Graves' disease of Chinese patients are age- and sex-related. *Tissue Antigens*, 34(3):179–184.
- ZAMANI M., SPAEPEN M., BEX M., BOUILLON R., CASSIMAN J-J. (2000). Primary role of the HLA class II DRB1\*0301 allele in Graves disease. *Am J Med Genet*, 95(5):432–437.