

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDA TLR4 POLİMORFİZMİ
VE MBL SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜN KIRIŞ SATILMIŞ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. İLKNUR KALELİ

DENİZLİ-2011

Prof. Dr. İlnur KALELİ danışmanlığında Dr. ÖZGÜN KIRIŞ SATILMIŞ tarafından yapılan "Böbrek transplantasyonunda TLR4 polimorfizmi ve serum MBL seviyelerinin değerlendirilmesi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. İlnur KALELİ

ÜYE: Doç. Dr. Nural CEVAHİR

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Ergun METE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

12.10.2011
(gün/ay/yıl)

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI
Prof. Dr. Mustafa KILIÇ



Kendisinden çok şey öğrendiğim değerli tez hocam Prof.Dr. İlknur Kaleli'ye, bizlere her şeyden önce insan olarak değer veren, tökezlediğimizde yol gösteren, yolumuzda yürümeyi güdüleyen, her zaman sevgi ve saygıyla bahsedeceğim çok değerli hocam Doç.Dr. Çağrı Ergin'e, aydınlık yolumuz puslandığında ışığımız olan, bilgilerini bizlerle lütufsuzca paylaşan, benim için büyük bir bilge olan çok değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Mustafa Şengül'e, yüreğindeki sevgiyi bizlerle paylaşan değerli hocam Doç.Dr. Nural Cevahir'e, bilimin ciddi yüzünde bizlere gülümseyen bir pencere açan değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Ergun Mete'ye, bölüm hocalarımızdan Doç.Dr. Melek Demir'e,

Tezimin istatistik çalışmalarında desteğini benden esirgemeyen sevgili hocam, ağabeyim Doç.Dr. Mehmet Zencir'e, tez çalışmalarımda ve sonrasında desteğini gördüğüm Gen-Mar firmasından Cankut Çubuk'a,

Tezime destek olan Doç.Dr.Belda Dursun ve Doç.Dr. Çağatay Aydın'a, Organ Nakli Birimi Hemşiresi Türkan Takım'a

Dört yılda tek bir aile gibi olduğumuz, en zor anlarımda hep yanı başımda duran, destek olan, asistanlığımın en önemli kazanımlarından biri olan sevgili dostum Arş.Gör.Dr. Yüksel Akkaya'ya, tatlılığı, enerjisi, bilgisiyle hayatımda anlamlı bir yeri olan arkadaşım Uzm.Dr. Cansev Yılmaz'a, önce ilkeli insan sonra hekim duruşuyla gelecek ve hekimlik adına beni umutlandıran çok değerli arkadaşım Arş.Gör.Dr. Orçun Zorbozan'a, birlikte hep uyum içinde çalıştığımız Nilgün Arıkan, Utku Taşçı, Yasemin Şanal, Mustafa Uysal, Yasemin Dağ, Nesrin Buluş, Alev Çelik, Kubilay Taylan, Nergiz Keskin Koruk, Zahide Atalay Coşkun, İbrahim Çırnaz, Musa Arıkan, Hikmet Dağ biyolog, teknisyen tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Yürüdüğüm yolda hep sabırla, sevgi ve anlayışla yanımda, dimdik duran, beraber yürüyen, çok emek veren, yüreğini yüreğime demirleyen can yoldaşım, vazgeçilmezim, sevgili eşim Barış Satılmış'a

Bana en zor şartlarda bile ilkeli, erdemli, dürüst, emeğe saygılı bir birey olmayı öğreten, bu uğurda dimdik ayakta kalmamı salık veren, her zaman olduğu gibi asistanlık sürecinde de benimle birlikte yol alan canım annem, babam Lütfiye ve Turan Kiriş'e, aslında bana hayatı anlatan sevgili kız kardeşim Alkım Kiriş'e, hayatımdaki en anlamlı kişilerden olan, bakış açısı, bilgisi, yüreğiyle bana yol gösteren, ışığım olan, varlığıyla beni hayata bağlayan canım kardeşim Görkem Andaç Kiriş'e sonsuz teşekkürler ediyorum.

Ve tezimi hep doktor olmamı isteyen ama göremeyen dedem H. Mehmet Güler'e ithaf ediyorum....

Dr. Özgün KİRİŞ SATILMIŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
İMMUN SİSTEM	5
Drosophila Toll ve İlişkili Proteinler.....	6
MEMELİLERDE TOLL-LİKE RESEPTÖRLERİ	7
Bakteriyel Tanımda TLRs.....	8
Mantar ve Protozoan Tanınmasında TLRs.....	9
Viral Tanımda TLRs.....	9
Endojen Ligandların Tanınmasında TLRs.....	10
TLRs ARACILIKLI SİNYAL YOLAKLARI	10
TLRs sinyal yollarında TIR domeni içeren uyarlayıcılar.....	11
MyD88.....	11
TIRAP/Mal.....	12
TRIF.....	12
TRAM.....	13
SARM.....	13
TLRs Sinyal Yolları.....	14
MyD88 bağımlı sinyal yolağı.....	14
MyD88 Bağımsız Sinyal Yolağı (TRIF Bağımlı Sinyal Yolağı).....	15
TLR4 POLİMORFİZMİ	16
TLR4 POLİMORFİZMİNİN SAPTANMASI	17
Real- time Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	17
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	
Restriksiyon Enzim Analizi.....	18

PCR-RFLP.....	18
DNA Dizi Analizi.....	19
PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) (Tek Sarmal Yapısal Polimorfizm).....	19
MANNOZ BAĞLAYICI LEKTİN (MBL).....	19
MBL EKSİKLİĞİ.....	22
MBL EKSİKLİĞİNİN SAPTANMASI.....	24
Serum/Plazma MBL Ölçümleri.....	24
MBL Genotipleme.....	24
Fonksiyonel MBL Ölçümleri.....	24
GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	26
DNA ELDESİ.....	26
Real-Time PCR ile TLR4 Polimorfizmlerinin Saptanması.....	28
MBL DEĞERLERİNİN ELISA İLE ÖLÇÜLMESİ.....	32
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
BULGULAR.....	36
TARTIŞMA.....	43
SONUÇLAR.....	61
ÖZET.....	63
YABANCI DİL ÖZETİ	65
KAYNAKLAR.....	67

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo -1 İnsan TLR4 Thr399İle SNPs'ı saptamak için kullanılan primer ve proplar.....	28
Tablo-2 Thr399İle polimorfizminin araştırılmasında hazırlanan PCR karışımı.....	29
Tablo -3 Asp299Gly polimorfizminin araştırılmasında hazırlanan PCR karışımı.....	29
Tablo -4 Asp299Gly polimorfizmi için PCR döngüsü.....	30
Tablo -5 Thr399İle polimorfizmi için PCR döngüsü.....	30
Tablo -6 TLR4 Thr399İle polimorfizmini katılımcıların çeşitli özelliklerine göre dağılımı.....	38
Tablo -7 TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyesinin katılımcıların çeşitli özelliklerine göre dağılımı.....	38
Tablo -8 TLR4 Thr399İle polimorfizminin katılımcıların test sonuçlarına göre dağılımı.....	40
Tablo-9 TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyesinin katılımcıların test sonuçlarına göre dağılımı.....	41
Tablo-10 TLR4 Thr399İle polimorfizminin idrar kültür sonuçlarına göre dağılımı.....	42
Tablo-11 TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyelerinin idrar kültür sonuçlarına göre dağılımı.....	42

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Şekil-1	Asp299Gly vahşi tip.....	31
Şekil-2	Asp299Gly heterozigot mutant.....	31
Şekil-3	Asp299Gly homozigot mutant.....	31
Şekil-4	Thr399Ile vahşi tip.....	32
Şekil-5	Thr399Ile heterozigot mutant.....	32
Şekil-6	MBL ELISA Standart Eğrisi ve Absorbans Değer Grafiği.....	34

KISALTMALAR DİZİNİ

ARM	: Armadillo tekrar motifi
AP-1	: Aktivasyon proteini-1
APC	: Antijen sunan hücreler
Asp-HM	: Asp299Gly heterozigot
Asp-HOM	: Asp299Gly homozigot
Asp-DT	: Asp299Gly doğal tip
BKV	: Polyomavirus BK
C	: Kompleman
CMV	: Cytomegalovirus
CpG DNA	: Deoksiribonükleik asitin sitozin-fosfat-guanin bölgesi
dsRNA	: Double-stranded RNA
Dif	: Dorsal benzeri immünite faktörü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FRET	: Fluorescence resonance energy transfer
HSP	: Hısı şok proteinleri
HSV-1	: Herpes simplex virus 1
IFN- β	: Interferon-beta
I κ B	: NF- κ B inhibitor protein
IKK	: I- κ B kinaz
IKKi	: Uyarılabilir IKK
IL-/1 NF- κ B	: İnterlökin 1/nükleer faktör- κ B
IL-1R	: Tip 1 IL-1 reseptörü
IRAKs	: IL-1 reseptör ilişkili kinazlar
IRF-3	: İnterferon düzenleyici faktör 3
JCV	: Polyomavirus JC
JNK	: c -Jun N-terminal kinaz
LCMV	: Lymphocytic choriomeningitis virüsü
LRRs	: Lösinden zengin tekrarlar
LPS	: Lipopolisakkarit

MAC	: Membran atak kompleksi
MAp19	: MBL ilişkili 19 kDa'luk protein
MAPKs	: Mitojen aktif protein kinaz
MASP	: Mannan bağlayıcı lektin ilişkili serin proteaz
MASPs	: Mannan bağlayıcı lektin ilişkili serin proteazlar
MBL	: Mannoza bağlayıcı lektin
MCMV	: Fare <i>Cytomegalovirus</i> ' u
mRNA	: Messenger RNA
MyD88	: Miyeloid diferansiyasyon faktör 88
NEMO	: IKK- γ /NF- κ B esansiyel modülatörü
NK	: Doğal öldürücü hücreler
NO	: Nitrik oksit
PAMPs	: Patojen ilişkili moleküler örgüler
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PCR-SSCP	: PCR-Tek sarmal yapısal polimorfizm
PRR	: Örgüleri tanıyan reseptörlerdir
PVAN	: Polyomavirus nefropatisi
RE	: Restriksiyon enzimleri
RFLP	: Restriksiyon enzim analizi
SAM	: Steril α motif
SARM	: Steril α ve HEAT-Armadillo motifleri
SNPs	: Tek nükleotit polimorfizmi
ssRNA	: Single-stranded RNA
TAK1	: Transformasyon edici büyüme faktörü β aktif protein kinaz 1
TBK1	: TRAF ailesi ilişkili NF- κ B aktivatörü (TANK) bağlayıcı kinaz 1
Thr-HM	: Thr399Ile heterozigot mutasyon
Thr-DT	: Thr399Ile doğal tip
TICAM1/TRIF	: TIR domaini içeren uyarlayıcı molekül 1/interferon β 'yı indükleyen TIR domaini içeren uyarlayıcı molekül
TIR	: Toll/IL-1 reseptörü
TIRAP/Mal	: TIR domaini içeren uyarlayıcı/MyD88 uyarlayıcı benzeri
TLR	: Toll-like reseptörü

TLRs	: Toll-like reseptörleri
TMB	: Tetramethylbenzidine
TRAF6	: TNF reseptör ilişkili protein 6
TRAM	: TRIF ilişkili uyarlayıcı molekül
VSV	: Vesicular stomatitis virus

GİRİŞ

Böbrek nakli son dönem böbrek yetmezliği için sağkalımı uzatan bir tedavi seçeneğidir. Organ bağışının az olması da göz önünde bulundurulduğunda nakil edilen organın korunmasının önemi daha da artmaktadır. Böbrek nakil başarısızlığının iki önemli sebebi vardır; rejeksiyon ve enfeksiyon. Rejeksiyonun engellenmesi için verilen immünsupresif tedavi enfeksiyon riskini arttırmaktadır.

Son yıllarda, farklı organ nakilleri ve enfeksiyonlarında Toll-like reseptör 4 (TLR4) polimorfizminin ve plazma/serum mannoz bağlayıcı lektinin (MBL) önemi üzerinde durulmaktadır. TLR4 polimorfizmi ve düşük MBL seviyelerinin çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığını bildiren çalışmaların yanında TLR4 polimorfizmi olan alıcılarda rejeksiyon oranlarının azaldığını gösteren çalışmalar da vardır.

TLR4 polimorfizmi, MBL seviyeleriyle enfeksiyon ve rejeksiyon arasında birliktelik bulunması önemlidir. Bu birliktelik nakil edilen dokunun uzun süre fonksiyon görmesi ve enfeksiyondan korunması amacıyla yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi Organ Nakli Birimince takip edilen alıcı ve vericilerde TLR4 polimorfizminin ve MBL seviyelerinin tespit edilmesi, saptanan sonuçlarla örnek özellikleri, enfeksiyon ve rejeksiyon arasında bir birliktelik olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar TLR4 polimorfizmi ve MBL seviyelerinin iyi greft gidişi ve nakil sonrası enfeksiyon riskine etkisini ortaya çıkarmanın yanı sıra Denizli'deki nakil hastalarında

TLR4 polimorfizmi ve MBL eksikliği sıklığının saptanması diğer b6lgelerdeki nakil hastalarındaki sıklığın bilinmesine y6nelik çalışmalara kaynak olacaktır.

GENEL BİLGİLER

Son dönem böbrek yetersizliğinin iki temel tedavi seçeneği vardır. Bunlar diyaliz ve organ naklidir. Diyaliz tedavisi hemodiyaliz ve periton diyalizi olmak üzere ikiye ayrılırken, böbrek nakli de verici yönünden kadavradan ve canlıdan olmak üzere iki şekilde yapılabilir (1). Nakil son dönem böbrek yetersizliğinde önemli bir tedavi yöntemidir (2). Başarılı bir böbrek nakli mortalite riskinde azalma ve yaşam kalitesini artış sağlamaktadır (3).

İlk başarılı deneysel böbrek nakli 1902'de Avusturya'da Viyana Tıp Okulu'nda hayvanlarda gerçekleştirilmiştir. 1933'de ilk insandan insana böbrek nakli yapılmıştır. Boston Peter Bent Brigham Hastanesi'nde 1954'te Joseph E. Murray ve arkadaşları, ikiz kardeşlerin birinden diğerine ilk gerçek başarılı böbrek naklini gerçekleştirmişlerdir. Türkiye'de ilk başarılı organ nakli ise 3 Kasım 1975 yılında Dr. Mehmet Haberal ve ekibince Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde bir anneden oğluna yapılan canlıdan canlıya böbrek nakli olmuştur. Bunu 1978 yılında aynı ekibin kadavradan yaptığı ilk böbrek nakli izlemiştir (4, 5).

Geçtiğimiz son 20 yıl içerisinde özellikle doku reddinin immünobiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına, tedavi eden ve reddi engelleyen ilaçlardaki gelişmelere paralel olarak böbrek naklinin başarısı belirgin bir şekilde artmıştır. Bu başarıda cerrahi tekniklerdeki gelişmeler ve etkin antimikrobiyal ajanların kullanımının da payı büyüktür. Günümüzde birçok merkezde, nakli takip eden ilk bir yıl içerisinde akut rejeksiyon insidansı genellikle %20'nin altında olup, bir yıllık greft sağ kalımları %90'ın üzerindedir. Bütün bu gelişmeler sonucunda, son dönem böbrek yetmezliğinin tedavisinde böbrek nakli, hem sağ kalım avantajı hem de

yaşam kalitesinde yaptığı artışlar nedeniyle, tercih edilen renal replasman tedavisidir (6).

Organ naklinden sonra iki büyük tehlike vardır: enfeksiyon ve doku reddi. Organ nakli yapılan hastalar immünsupresif tedavi nedeniyle enfeksiyonlar açısından risk altındadır. Enfeksiyon riski immünsupresif tedavinin dozuna, süresine, içerisindeki ilaçların kendi etkilerine bağlı olarak değişkenlik gösterir (7).

Solid organ nakilleri sonrası en sık karşılaşılan fırsatçı patojen *Cytomegalovirus* (CMV)'dur. Genel popülasyonda çoğunlukla asemptomatik seyreden CMV enfeksiyonu, yoğun immünsupresif tedavi alan transplantasyonlu hastalarda ciddi hastalık tablolarına neden olabilmekte ve bu durum greft kaybı ya da mortalite artışına neden olmaktadır. Böbrek nakil alıcılarının %60'ından fazlası aktif CMV enfeksiyonu geçirmekte ve %20'den fazlasında semptomatik hastalık olmaktadır. CMV hastalığının klinik tanısı zordur; hastalıktan korunmada ya da hastalığın gelişiminin izlenmesinde erken tanı için laboratuvar testlerine gereksinim vardır. Kanda CMV PCR, lökositlerde CMV pp65 antijen testleri başvurulan kantitatif yöntemlerdir. Bu testler kullanılarak CMV enfeksiyonu sıklıkla hastalık gelişmeden önce saptanabilmektedir. Viral yükün hesaplanması hastalık gelişiminin ve antiviral tedavinin izlenmesini sağlamaktadır (8, 9, 10).

Polyomavirus BK (BKV) enfeksiyonu sağlıklı bireylerde çocukluk çağından itibaren asemptomatik olarak gözlenebilmektedir. Böbrek nakil hastalarında immünsupresyon geliştiğinde BKV reaktivasyonu viral replikasyonla sonuçlanmakta ve polyomavirus nefropatisi (PVAN) gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır (11, 12). Polyomavirus JC (JCV), klasik olarak

immüsuprese hastalarda progresif multifokal ensefolapatinin etkeni olarak bilinmekle beraber PVAN olgularına düşük oranda neden olmaktadır (13).

İMMÜN SİSTEM

Memelilerde, immün sistem doğal ve edinsel immüniteyi içerir. Edinsel immünite sadece omurgalılarda görülen, antijen spesifik T ve B hücrelerinin aracılık ettiği oldukça sofistike bir sistemdir. Organ naklinde edinsel immünitenin rolü uzun yıllardır bilimsel araştırmaların merkezinde olmuştur. Doğal immün sistem hemen hemen tüm çok hücreli organizmalarda patojenik mikroorganizmalara karşı konak savunmasında ilk basamaktır ve filogenetik olarak korunmuştur (14, 15, 16, 17, 18).

Uzun yıllar boyunca doğal direncin özgüllük göstermediği ve birçok enfeksiyonun üstesinden gelecek güçte olmadığı kabul edilmiştir. Ancak bugün, doğal direncin güçlü bir erken savunma sistemini oluşturduğu; TLR ve MBL gibi doğal bağışıklık elemanlarının potansiyel enfeksiyöz mikroorganizmaların tanınmasında ve edinsel immünite aktif hale gelene kadar enfeksiyonun kontrolünde görev alan ilk bileşenler olduğu anlaşılmıştır. Doğal bağışıklık sadece erken savunma sistemi özelliğine sahip değildir; ayrıca edinsel bağışıklığın en etkili biçimde gelişme göstermesini sağlayacak şekilde farklılaşmasında da rol oynar. Doğal direnç ve edinsel bağışıklık arasında çift taraflı bir etkileşim söz konusudur (19, 20, 21).

Doğal bağışıklığın yapıtaşları, konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan yapıları tanırlar. Doğal bağışıklığın tüm yapıtaşları çok çeşitli bakteri, virus ve mantarları tanıma özelliğine sahiptirler. İmmün sisteminin aktivasyonunda lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipoproteinler ve bakteriyel

deoksiribonükleik asitin sitozin-fosfat-guanin bölgesi (CpG DNA) gibi mikrobiyal bileşenler yer alır. Doğal bağışıklığın hedefi olan bu mikrobiyal moleküllere, aynı tip mikroorganizmalar üzerinde bulunmaları nedeniyle patojen ilişkili moleküler örgüler (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) adı verilir. Bu ortak yapıları tanıma özelliğine sahip doğal bağışıklığın reseptörleri ise örgüleri tanıyan reseptörlerdir (pattern recognition receptors, PRR) (19, 20, 22, 23). Doğal immünite nakil edilen solid organın bağışıklık sistemi tarafından tanınmasında önemli bir rol oynamaktadır (24). Böcekler, bitkiler ve memelilerin doğal immün sistemleri arasında büyük benzerlikler vardır. Özellikle bir meyve sineği olan *Drosophila melanogaster* ile yapılan çalışmaların doğal immünite kavramına katkısı olmuştur (22).

Drosophila Toll ve İlişkili Proteinler

Toll ve Toll ilişkili proteinler genellikle memeliler, bitki ve böceklerde eksprese edilir. Toll tip 1 transmembran reseptörüdür (25). Toll ailesi üyeleri ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de meyve sineği embriyosunda dorsaventral oluşumu kontrol eden yolakta görev alan maternal etkili gen olarak bulunmuştur (20). *D. melanogaster*'in edinsel immün sistemi yoktur, mikrobiyal enfeksiyonları doğal immünite sayesinde sınırlandırmakta ve yok etmektedir. Toll ailesi de bu doğal immünitenin merkezindedir. Daha sonra Toll'un erişkin sinekte antifungal yanıt için de önemli olduğu bulunmuştur (22, 26).

Sineklerdeki Toll yolağı, memelilerdeki interlökin 1/nükleer faktör- κ B (IL-1/NF- κ B) yolağıyla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Toll'un sitoplazmik domaini sisteinden zengin karboksi ucu ile memeli tip 1 IL-1 reseptörüne (IL-1R) benzemektedir. Toll sinyali ligand bağımlı reseptör dimerizasyonu ile başlamaktadır. Toll'un ligandı olarak "Spätzle" olarak bilinen bir salgısal protein görev yapmaktadır. Spätzle'nin etkinliği "Easter"

olarak bilinen bir proteaz tarafından düzenlenmektedir. Toll'un Spätzle tarafından bağlanması, "Tube" olarak bilinen bir uyarlayıcı proteinin katılmasını ve bir sitoplazmik serin/treonin kinaz olan "Pelle"nin aktivasyonunu sağlar. Drosophila miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88) Pelle geninin geri bölgesidir ve Toll sinyalinde hem Toll hem de Pelle ile direkt etkileşen bir protein olarak görev yapmaktadır. Pelle, sitoplazmada Dorsal ve Dorsal benzeri immünite faktörü (Dif) proteinleriyle kompleks yapan "Cactus"ün yıkımını kontrol etmektedir. Dorsal ve Dif inflamatuvar yanıtta anahtar düzenleyici olan transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin homologudur. Cactus yıkıldığı zaman, dorsal nukleusa transloke olmakta ve özgül hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir (14, 27, 28, 29, 30, 31).

Toll reseptör mutasyonu olan Drosophila'da mantar enfeksiyonlarına artmış yatkınlık gözlenmiştir. Bu da Toll reseptörünün mantar enfeksiyonlarının saptanmasında ve mantara karşı konak savunmasının başlatılmasındaki önemini göstermektedir (32, 33).

MEMELİLERDE TOLL-LİKE RESEPTÖRLERİ

Toll'un Drosophila'da tip 1 transmembran reseptörü olarak tanımlanmasını takiben, veritabanı araştırmaları insanda homolog Toll'un keşfini sağlamıştır ve Toll-like reseptörleri (TLRs) olarak adlandırılmıştır (34). TLRs antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunurlar ve PRRs'lerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır (35, 36). Bu güne kadar en az 13 TLRs tanımlanmıştır (37, 38, 24). Amino asit sekans analiziyle TLR ailesi 5 alt aileye ayrılmaktadır; TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR9 alt aileleri. TLR2 alt ailesi TLR1, TLR2, TLR6 ve TLR10'dan; TLR9 alt ailesi TLR7, TLR8 ve TLR9 'dan oluşmaktadır. TLR3, TLR4 ve TLR5 alt aileleri ise yalnızca kendilerinden oluşmaktadır (14). Her TLR özgül olarak PAMPs tanır; TLR2 zimosan, lipoteikoik asit, lipoproteinleri; TLR3 double-stranded RNA'yı (dsRNA), TLR5

flagellini, TLR7/8 single-stranded RNA'yı (ssRNA), TLR9 CpG DNA'yı tanımaktadır (33,16). TLR11'in üropatojenik bakteriyel bileşenleri tanıdığı düşünülmektedir, TLR11 yetersiz farelerde bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara yatkınlık gösterilmiştir (39). En önemli PRRs'lerden biri olan TLR4; gram negatif bakteri LPS'ini, fungal patojenlerin mannanını, *Mycobacterium tuberculosis*'in çözünebilir komponenti gibi eksojen ligandları; fibronektin ve çeşitli ısı şok proteinleri gibi endojen ligandları tanımaktadır (22, 33).

TLRs çeşitli seviyedeki messenger RNA (mRNA), proteinler, farklı hücre tipleri ve dokularda bulunmaktadır. TLRs, eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri, nötrofiller gibi doğal immün sistemle ilişkili diğer hücrelerde olduğu gibi doğal öldürücü hücreler (NK), dendritik hücreler, monositler ve makrofajları içeren antijen sunan hücrelerin (APC) yüzeyinde de bulunurlar. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11 hücre yüzeyinde; TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 endoplazmik retikulum, endozom, lizozom, endolizozom gibi intraselüler veziküllerde eksprese olmaktadır. TLRs PAMPs'ı lokal olarak tanıyabilir ve böylece hem doğal immün yanıt başlatılmakta hem de edinsel immün yanıt hazırlanmaktadır (34, 40, 41).

Yapılan çalışmalar TLR 2, 3, 4 ve 9'un böbrek hastalıklarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (42).

Bakteriyel Tanımda TLRs

Gram negatif bakteri dış membranını oluşturan LPS, güçlü bir doğal immünite uyarıcısıdır (32). LPS TLR4'ü uyararak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini başlatmaktadır (43). Farelerde TLR4 genindeki mutasyon LPS'e düşük yanıt, gram negatif enfeksiyonlara artmış yatkınlığa neden olmaktadır (15, 43) .

TLR2, gram pozitif bakteri hücre duvarında yer alan peptidoglikan ve lipoteikoik asitleri tanır. TLR2 yetersiz fareler bir gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarına oldukça duyarlıdır. Gram pozitif bakteriyel bileşenlere ilaveten TLR2, çeşitli bakterilerdeki lipoprotein/lipopeptidler, *Mycobacterium* türlerindeki lipoarabinomannan, *Staphylococcus epidermidis*'deki çözünebilir bir fenol modulini, *Treponema maltophilum*'daki glikolipitler ve *Neisseria* türlerinin dış membranında yer alan porinler gibi çeşitli diğer bakteriyel bileşenlerin tanınmasıyla ilişkilidir. TLR2 ve TLR4 tarafından tanınan bakteriyel bileşenler çoğunlukla bakteri hücre membranında sunulur. Gram negatif bakteri dış membranından dışarı uzanan flajellanın bir protein bileşeni olan flajellinin TLR5 aracılığıyla immün hücreleri aktive ettiği gösterilmiştir. Bakteriyel DNA TLRs için bir ligand olarak iş görmektedir. TLR9 metillenmemiş bakteriyel CpG DNA' yı tanımaktadır (15, 33, 44).

Mantar ve Protozoan Tanınmasında TLRs

Mantarın hücre membranında bulunan glukon, mannan, proteinler, kitin ve glikolipitlerin ham karışımı, zimosan TLR2 yoluyla immün hücreleri aktive eder. *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* ve *Plasmodium falciparum* gibi protozoanlar TLRs tarafından tanınmaktadır. *Trypanosoma*'dan elde edilen glukozilfosfatidilinozitol, glikoinozitolfosfolipit ve genomik DNA sırasıyla TLR2, TLR4 ve TLR9'u aktive etmektedirler. *T.gondii* takizoitlerinin farelerde TLR11 tarafından tanındığı gösterilmiştir. *Plasmodium*'un şizontları dendritik hücreleri TLR9 aracılığıyla aktive etmektedir (15, 33, 45).

Viral Tanımda TLRs

Viruslar genetik materyal olarak DNA ya da RNA bulundurmaktadır. Viral DNA, dsRNA, ssRNA, yüzey glikoproteinleri gibi çeşitli yapısal

bileşenler TLRs tarafından tanınmaktadır. Viral tanınmada TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ve TLR9 görev yapmaktadır. TLR9 viral DNA'yı tanır; *Herpes simplex virus 1* (HSV-1), HSV-2 ve fare *Cytomegalovirus'* u (MCMV) inflamatuvar sitokinleri TLR9 aracılığıyla uyarmaktadır. TLR7 ve TLR8 genleri yüksek oranda benzerlik gösterirler ve ssRNA' yı tanımaktadır. TLR3 dsRNA'yı tanımaktadır. TLR3 yetersizliği olan farelerde MCMV, *Vesicular stomatitis virus* (VSV), *Lymphocytic choriomeningitis virüsü* (LCMV) ve *Reovirus* enfeksiyonlarına artmış yatkınlık gösterilmiştir. Viral zarf proteinleri TLR2 ve TLR4 tarafından tanınmaktadır (15, 32, 46, 47).

Endojen Ligandların Tanınmasında TLRs

TLRs'nin özellikle de TLR4'ün endojen ligandların tanınmasında yer aldığı gözlenmiştir (22, 33, 48, 49). TLR4 fibrinojen, fibronektin, hyaluronik asidin oligosakkaritlerini ve heparan sülfatın polisakkarit parçalarını içeren ekstraselüler matriks bileşenlerini tanımaktadır. TLR4 ve TLR2 ısı şok proteinleri (Heatshock protein, HSP) HSP60 ve HSP70'in tanınmasında yer almaktadır. Endojen ligandların inflamasyon sırasında üretilmesi, TLRs'nin enfeksiyon varlığında inflamatuvar süreçlerle alakalı olduğunu göstermektedir (22, 33, 50).

TLRs ARACILIKLI SİNYAL YOLAKLARI

TLRs ekstraselüler kısmında lösinden zengin tekrarlar (LRRs) ve sitoplazmik kısmında Toll/IL-1 reseptör (TIR) domaini barındırır. TLRs'nin TIR domaini IL-1 reseptör ailesinin sitoplazmik bölgesiyle yüksek benzerlik gösterir (20, 32, 51-53). TLRs aracılıklı sinyal yolları sitoplazmik TIR domaininden köken alır. TIR domaini içeren uyarlayıcı molekülleri MyD88, TIR domaini içeren uyarlayıcı/MyD88 uyarlayıcı benzeri molekül (TIR-domain-containing adapter/MyD88 adaptor-like TIRAP/Mal), TIR domaini içeren uyarlayıcı molekül 1/interferon β 'yı indükleyen TIR domaini içeren uyarlayıcı molekül (TIR-domain-containing adaptor molecule 1/ TIR domain

containing adaptor inducing interferon β , TICAM1/TRIF), TRIF ilişkili uyarlayıcı molekülün (TRIF-related adaptor molecule, TRAM) keşfiyle farklı TLRs'nin farklı sinyal yollarını aktive ettiği anlaşılmıştır (41).

TLRs sinyal yollarında TIR domaini içeren uyarlayıcılar

TLR sinyalinde önemli rol oynayan 5 sitozolik TIR domaini içeren uyarlayıcı vardır: MyD88, TIRAP/Mal, TICAM1/TRIF, TRAM, steril α ve HEAT-Armadillo motifleri (sterile α -and armadillo-motif-containing protein, SARM) (54). MyD88, TIR ailesinin tanımlanan ilk üyesidir ve TLR3 dışında bütün TLRs tarafından kullanılır. MyD88 inflamatuvar sitokinleri indüklemek için, mitojen aktif protein kinaz (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) ve transkripsiyon faktör NF- κ B'yı aktive etmektedir. TRIF ise TLR3 ve TLR4 tarafından kullanılır, transkripsiyon faktörleri NF- κ B ve interferon düzenleyici faktör 3'ün (Interferon regulatory factor 3, IRF3) aktivasyonunu, tip 1 interferon ve inflamatuvar sitokinlerin indüklenmesini sağlamak için alternatif yolu tetiklemektedir. TRAM ve TRAP'ın uyarlayıcıları olarak sınıflandırılmasındaki fonksiyonu; TRIF'in TLR4'e, MyD88'in TLR2 ve TLR4'e katılmasıdır (41).

MyD88

TLRs'de genel olarak en çok kullanılan molekül MyD88'dir. MyD88, 296 aminoasitten oluşan bir proteindir ve ilk olarak M1 monolösemik hücre dizisinde yeni bir miyeloid diferansiyasyon primer yanıt geni olarak tanımlanmıştır. Daha sonra IL-1 ve IL-18 sinyal yollarında yer aldığı gösterilmiştir. TLR3 dışında tüm TLRs üyeleri ve IL-1R üst ailesi tarafından sinyal verilen ortak bir uyarlayıcı protein olarak bilinmektedir. TLRs ve IL-1 ailesi reseptörleri, TIR domainleri yoluyla MyD88 ile etkileşerek transkripsiyon faktörleri NF- κ B ve aktivasyon proteini 1'i (activating protein-1, AP-1) aktive etmektedir. Bu etkileşime MyD88'in iki yapısal domaini aracılık etmektedir: karboksi terminal TIR domaini TLRs'nin sitoplazmik ucundaki benzer

domainlerle ve aminoterminal ölüm domaini, serin-treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan IL-1R ilişkili kinazın (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) domainiyle etkileşmektedir (54, 55).

IL-1 reseptör ilişkili kinazlar (IL-1 receptor-associated kinases, IRAKs) TIR ailesinin sinyal transdüksiyonunda önemli mediyatörlerdir, farklı gen ekspresyonu gösteren 4 üyesi bulunmaktadır; IRAK1, IRAK2, IRAK4 ve IRAK M. IRAKs bir merkezi serin/treonin kinaz domaini ve bir N terminal ölüm domaini içermektedir. IRAK1 ve IRAK4'de intrinsik kinaz aktivitesi bulunurken IRAK2 ve IRAK M'de bulunmamaktadır. TIR uyarımından sonra IRAK1'in kinaz aktivitesi artar ve kinaz domaini NF- κ B aracılıklı sinyal için gereklidir. IRAK4'ün TIR sinyalinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (56).

TIRAP/Mal

TIRAP/Mal olarak adlandırılan ikinci bir uyarlayıcı molekül olarak tanımlanmıştır. TIRAP, TLR4 aracılıklı MyD88 bağımlı yolak için elzem iken MyD88 bağımsız sinyal yolağı için değildir. MyD88 TLR4'e direkt bağlanmaz, bunun yerine TLR4 ile ilişkili olan TIRAP ile etkileşime girmektedir. TIRAP'ın TLR2' nin MyD88 bağımlı sinyal yolakları için de gerekli olduğu gösterilmiştir (32, 56-58).

TRIF

Araştırmalar sonucunda TIR domaini içeren üçüncü uyarlayıcı molekül; TRIF tanımlanmıştır. MyD88 ve TIRAP gibi TRIF'in fazla ekspresyonu da NF- κ B bağımlı gen promotörünün aktivasyonu ile sonuçlanır. MyD88 ya da TIRAP'dan farklı olarak TRIF'in fazla ekspresyonu Interferon-beta (IFN- β) promotörünün aktivasyonunu da sağlar. Bu nedenle bu molekül IFN- β 'yı indükleyen TIR domaini içeren uyarlayıcı olarak adlandırılır. Mutant farelerle

eş zamanlı yapılan iki bağımsız çalışma TRIF'in, TLR3 ve TLR4 aracılığı MyD88 bağımsız yolak için elzem olduğunu göstermiştir (32, 54, 59, 60).

TRAM

Dördüncü TIR domaini içeren uyarlayıcı molekül TRAM olarak tanımlanmıştır. Bu molekülün TIR domaini, TRIF'inkine çok benzediği için molekül TRIF ilişkili uyarlayıcı molekül (TRAM) olarak adlandırılmıştır. TRAM yetersiz farelerde TLR4 ligandlarına yanıtta normal IRAK-1 (MyD88 bağımlı yolak) fakat ciddi zayıflamış IRF-3 (MyD88 bağımsız/ TRIF bağımlı yolak) aktivasyonu ve TLR3 ligandına normal yanıt saptanmıştır. Bu bulgular TRAM'ın özgül olarak TLR4 aracılığı MyD88 bağımsız/TRIF bağımlı yolda yer aldığını göstermektedir (32, 56, 61, 62).

SARM

TIR domaini içeren 5. uyarlayıcı molekül steril α ve HEAT-Armadillo motifleri (SARM) olarak isimlendirilmekte, C-terminal TIR domaini içermektedir. SARM, iki steril α motif (SAM) domaini ve bir Armadillo tekrar motifi (ARM) içermektedir (54, 63, 64). SAM domaini protein-protein etkileşimlerine aracılık etmektedir. Armadillo tekrarları β -kateninin ligandlarıyla etkileşimine, diğer proteinlerle yapısal kompleksler oluşturmaya aracılık etmektedir. SARM'ın TLR sinyalindeki rolü tam olarak açıklanamamıştır (54). SARM'ın TLR sinyalinde rol aldığı ve diğer dört uyarlayıcı molekülün tersine NF- κ B ve IRF aktivasyonunun negatif düzenleyicisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (57, 65).

TLRs Sinyal Yolakları

TLR sinyal yolakları genel olarak ikiye ayrılır: MyD88 bağımlı sinyal yolağı ve MyD88 bağımsız yolak (TRIF bağımlı yolak). MyD88 bağımlı sinyal

yolağı TLR3 dışındaki tüm TLRs'de ortak iken; MyD88 bağımsız yolak TLR3 ve TLR4'e özgüdür (40). TLR4 sinyalinde MyD88 bağımlı yolak TIRAP'ın katılımıyla aktive olurken; MyD88 bağımsız yolak TRAM'ın katılımıyla aktive olmaktadır (38).

MyD88 bağımlı sinyal yolağı

MyD88'in karboksi terminal TIR domaini, TLRs'nin TIR domainiyle birleşmektedir. TLR2 ve TLR 4 sinyalinde MyD88 reseptöre bağlanmak için TRAP'a gereksinim duymaktadır. Bu uyarımdan sonra MyD88, N terminal ucundaki ölüm domaini aracılığıyla IRAKs'a katılır. Bu uyarıya yanıt olarak IRAK4 ve IRAK1 fosforile olup MyD88'den ayrılmaktadır. Bu süreç TNF reseptör ilişkili protein 6'nın (TRAF6) aktivasyonu ile sonuçlanır. TRAF6 da transforme edici büyüme faktörü β aktif protein kinaz 1'i (Transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1) aktifler. TAK1 iki farklı yolağı aktive eder; I- κ B kinaz (IKK) kompleksi ve MAPKs. IKK kompleksi; IKK α , IKK β ve IKK- γ /NF- κ B esansiyel modülatöründen (IKK- γ /NF- κ B essential modulator, NEMO) oluşmaktadır. IKK kompleksi NF- κ B'nin aktivasyonunu sağlamaktadır. NF- κ B, sitoplazmada NF- κ B inhibitör protein (I κ B) sayesinde inaktif olarak bulunmaktadır. IKK kompleksi I κ B'nin fosforilasyonunu uyarır, bu da NF- κ B'nin nükleusa salınımına ve κ B bölgesine bağlanmasına izin verir (14, 17, 32, 38, 40).

TLR sinyalinde AP-1 aktivasyonu genellikle c-Jun N-terminal kinaz (c-Jun N-terminal kinase, JNK) gibi MAP kinazlar tarafından yapılmaktadır. TAK1'in MAP kinaz yolağını uyarması AP-1'in aktivasyonu ile sonuçlanır (17, 38).

MyD88'den başlayıp NF- κ B ve AP-1'in aktivasyonuna kadar giden bu sinyal yolağı hemen tüm TLRs tarafından kullanılmakta ve bu MyD88 bağımlı yolak inflamatuvar yanıtı kontrol etmektedir (17).

MyD88 Bağımsız Sinyal Yolağı (TRIF Bağımlı Sinyal Yolağı)

MyD88 bağımsız aşağı akım yolakları TLR3 ve TLR4 tarafından kullanılmakta, NF- κ B aktivasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlamaktadır. Bu yolakta NF- κ B aktivasyonu 2 farklı şekilde olur. TLR3'e bağlanan TRIF direkt TRAF6'ya bağlanır ve TRAF6 TAK1'i aktiflemektedir. TLR4 yolağında TRIF, TRAM'a gereksinim duyar. Aktif TAK1, I κ B proteinlerinin fosforilasyonunu katalizleyen IKK kompleksinin aktivasyonunu sağlamaktadır. I κ B'nin fosforilasyonu, NF- κ B'nin nukleusa geçişine izin vermektedir. Eş zamanlı olarak TAK1 kompleksi MAP kinaz yolağını da aktive etmektedir. Bu yolak AP-1'in aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır.

TRIF ayrıca TRAF3'e katılır ve TRAF ailesi ilişkili NF- κ B aktivatörü (TANK) bağlayıcı kinaz 1 (TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) binding kinase-1, TBK1) ve uyarılabilir IKK (inducible IKK, IKKi) ile etkileşmektedir. Bu yolağın sonucunda IRF3 fosforile olmaktadır. Fosforile olan IRF3, dimerize olup transkripsiyonu düzenlemek için nukleusa geçmektedir. NF- κ B, AP-1 ve IRF3 aktivasyonu, tip 1 IFN, özellikle de IFN β 'nin indüklenmesi için gereklidir. TLR4 sinyalinde iki tip NF- κ B aktivasyonu vardır. Bunlar NF- κ B'nin erken faz aktivasyonuna aracılık eden MyD88 bağımlı yolak ve geç faz aktivasyonuna aracılık eden MyD88 bağımsız yolaktır (38, 59).

TLR4 POLİMORFİZMİ

TLRs'nin keşfiyle sağlıklı ve hasta populasyonlarda, bakteriyel enfeksiyonlar ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olabileceği düşünülen birçok TLR polimorfizm çalışması yapılmıştır (66-70). Genetik polimorfizmlerin büyük kısmını tek nükleotit polimorfizmi (single-nucleotide polymorphism, SNPs) oluşturmakta ve populasyonda %1'in üzerinde görülmektedir. SNPs amino asit sekansını (sinonim olmayan SNPs) değiştirebilmekte, promoter özelliklerini etkileyebilmekte ya da tamamen sessiz kalabilmektedir (71, 72).

Memelilerde TLR4'ler arasındaki genetik varyasyon çoğunlukla ekstraselüler LRR bölgesinde görülmektedir. Bu bölgedeki en güçlü varyasyon PAMPs'ın tanınmasında meydana gelmektedir. İnsan TLR4 sekanslaması sinonim olmayan polimorfizm varyasyonlarının çoğunun LRR domainini kodlamak için 3. eksonda lokalize olduğunu ortaya çıkarmıştır. TLR4 LRR domainindeki büyük varyasyona rağmen insan populasyonunda sinonim olmayan polimorfizmlerin sıklığı düşüktür (%1). İstisna olarak iki sinonim olmayan polimorfizmin populasyon sıklığı >%5 olarak tanımlanmıştır. Bunlar amino asitin Asp299Gly lokalizasyonunda aspartik asit/glisin değişikliğine yol açan A/G değişimi ve amino asitin Thr399Ile lokalizasyonunda treonin/izolösin değişikliğine yol açan C/T değişimidir (33).

Arbour ve ark. tarafından Asp299Gly ve Thr399Ile eş ayrışım (cosegregating) polimorfizmleri olan kişilerin inhale LPS'ye karşı küntleşmiş yanıt verdiğini ilk olarak raporlanmıştır (73). Asp299Gly ve Thr399Ile TLR4 polimorfizmlerinin bakteriyel endotoksine yanıtta etkisinin bulunmasıyla, birçok genetik ilişki çalışması başlatılmıştır. Hem Asp299Gly hem de Thr399Ile mutasyonları, inhale LPS'e azalmış yanıtla ve çeşitli proinflamatuvar belirteçlerin plazma konsantrasyonlarında azalmayla ilişkili bulunmuştur (43). Bu iki mutasyon LPS'in indüklediği sitokin üretiminin azalması ve sepsisli hastalarda gram negatif bakteriyemi riskinin artmasıyla ilişkili bulunmuştur.

Böbrek ve akciğer nakillerinde yapılan çalışmalarda TLR4 polimorfizmleri ve greft sağkalımı arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (42, 74-78).

Bunların yanı sıra sağlıklı populasyonda da TLR4 polimorfizmleri incelenmiştir. Von Aulock ve ark. Almanya'da sağlıklı gönüllülerde yaptıkları çalışmada; 160 gönüllünün %9'unu Asp299Gly heterozigot ve %0.6'sının homozigot olduğunu tespit etmişlerdir (79). Sağlıklı bireylerde yapılan bir başka çalışmanın sonucu da benzer bulunmuş; 93 gönüllünün %11'i Asp299Gly heterozigot olarak saptanırken, homozigot birey saptanmamıştır (80).

TLR4 POLİMORFİZMİNİN SAPTANMASI

1. "Real-time" Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR)
2. Restriksiyon enzim analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)
3. PCR-RFLP
4. DNA Dizi Analizi
5. PCR-Tek sarmal yapısal polimorfizm (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism, PCR-SSCP)

"Real- time" Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir.

“LightCycler” sisteminin bir uygulamasında; hedefe özgül problar kullanılmaktadır. Burada problarla testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boya (donör boya) ile, diğeri 5' ucundan alıcı boya ile işaretlenmiştir. Problar hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. “Fluorescence resonance energy transfer, FRET” olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğeri bir ifade ile PCR döngüsü süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır (81).

Restriksiyon Enzim Analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE) ile çok özgül olarak DNA'nın kesilmesi, sonrasında agaroz jelde elektroforez edilip etidyum bromürle boyanması esasına dayanır. RFLP dört temel basamakta gerçekleşmektedir: DNA'nın izolasyonu, DNA'nın RE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve en son basamakta ise jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir (82).

PCR-RFLP

PCR ile özel bir genomik bölge amplifiye edilir. Amplifikasyon ürünü RE ile kesilir ve görüntülenir. Bu şekilde elde edilen kompleks olmayan bantlar değerlendirilerek ilişkili ve ilişkisiz izolatlar saptanır (82).

DNA Dizi Analizi

Dizi analizinde, dizisi saptanacak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir. Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması

yöntemi kullanılmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Dizi analiz sonucunu görülür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Yöntemin pahalı olması ve uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvar olanakları gerektirmesinden dolayı rutin laboratuvarlarda kullanımı zordur (83).

Tek Sarmal Yapısal Polimorfizm (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism, PCR-SSCP)

Primerler radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretlenir, amplifikasyon gerçekleştirilir ve elektroforez uygulanır. Bu yöntemle DNA'daki tek bir mutasyon bile gösterilebilmekte ve kısa sürede çok sayıda örnek çalışılabilmektedir (82).

MANNOZ BAĞLAYICI LEKTİN

Kompleman sistemi, patojenlerin istilasına karşı konak yanıtta, solid organ nakillerinde hem iskemi/reperfüzyon hasarı hem de rejeksiyona bağlı hasarda önemli bir rol oynar, doğal immüntenin kilit bileşenlerindedir, edinsel immün yanıtların başlatılmasında ve kontrolünde önemlidir (84-88). Kompleman sistemi aktive olduğunda inflamatuvar medyatörlerin üretimini, opsonize mikroorganizmalar ve immün komplekslerin temizlenmesini, hedef hücrelerin lizisini sağlamaktadır (89). Klasik, alternatif ve lektin yolağı olmak üzere üç ayrı kompleman yolağı vardır. Son yıllarda C2-bypass adında dördüncü bir yolak tanımlanmıştır. Bu yolakların her birinin; hedefi tanıma, anahtar kompleman bileşeni kompleman 3'ün (C3) ayrılması ve ortak kompleman son yolağının aktivasyonunda kendi mekanizması vardır. Sonuçta membran atak kompleksi (MAK) C5b-9'un oluşumuyla sonuçlanır (84, 87, 90).

Lektin yolu, MBL, L-fikolin, H-fikolin ya da M-fikolinin bir PRR olarak bakteri, mantar, virus ve parazitlerin yüzeyinde bulunan karbonhidrat ligandlarına bağlanması ile başlar (84, 91). MBL fagositlerdeki reseptörlere bağlanarak fagositik aktiviteyi arttırmaktadır (92). Mannoza bağlayıcı lektin, doğal immün sistemin anahtar bileşenidir, çocukluk çağında edinsel immünite olgunlaşmadığında ya da immün sistem baskılandığında mikroorganizmaları tanıma ve enfeksiyonu kontrol etmede ilk ögedir (93, 94).

MBL karaciğerde multimerik C-tipi lektin (kalsiyum bağımlı) olarak sentezlenir, akut faz reaktanıdır, serumda bulunur ve kollektin ailesinde yer almaktadır (84, 93, 95-97). MBL, altı trimerik ünitelerden oluşur, yapısı C1q'ya benzerlik göstermektedir (87, 98). MBL'nin ligandlarına bağlanması bir serin proteaz olan mannan bağlayıcı lektin ilişkili serin proteaz 2'nin (mannan-binding lectin associated serine protease 2, MASP-2) aktivasyonuna, bu da C4 ve C2'nin C4b2a oluşturmak üzere yıkımına neden olur (87, 98, 99). Komplemanın üç ayrı yolu C3 aktivasyonu sonrasında birleşerek MAK oluşumuna yol açar. C3 konvertaz C3'ü C4b2a3b, yani C5 konvertaz oluşturmak üzere parçalar. C5b, C6 ve C7 ile trimoleküler kompleks oluşturur, bunlar da hücre membranında C8 ve C9 kompleksine bağlanarak hücre zarında porlar oluşmasına yol açan MAK'ı meydana getirirler. Yüksek oranda por oluşumu hücre ölümünü, az miktarda por oluşumu hücreyel immün yanıtı uyararak hücre aktivasyonuna neden olur. MAK üretimi hücrelerin lizis ve aktivasyonuna yol açmanın yanı sıra, kompleman sistemin aktivasyonu kemoatraktif anaflatoksinler olan C3a, C5a'nın ve immün kompleks çözünürlüğünü arttıran C3b ve C4b'nin üretimini sağlar (98).

MBL, her biri 32 kD olan üç özdeş alt ünite içeren 96 kD'luk yapısal ünitelerden oluşur. Her alt ünite N terminal ucunda bir kollajen benzeri domain ve C terminal ucunda karbonhidrat tanıma domaini içerir (84, 93, 94, 100).

Dolaşımdaki MBL, dimer, trimer, tetramer, pentamer ve hegzamerleri içeren oligomerik yapıdan oluşmuştur. Dimerler ve trimerler biyolojik olarak aktif değildir; kompleman aktivasyonu için tetramer formu gereklidir. Yapısal ünitelerin oligomerik şekli MBL molekülünün çoklu karbonhidrat tanıma domainlerine sahip olmasına fırsat verir, multivalan ligand bağlanmasına yardımcı olur. MBL'nin her karbonhidrat tanıma domaini yapısal olarak özdeştir ve N-asetilglukozamin D-mannoz, N-asetilmannozamin ve L-fukozu içeren bir oligosakkarit dizisine bağlanabilir. Çeşitli şekerler farklı afinitelerde bağlansalar da, çoklu bağlanma bölgelerinin küme benzeri düzeni kompleman aktivasyonunun çok daha efektif olmasına izin verir (94, 97). MBL, Mannan bağlayıcı lektin ilişkili serin proteazlara (MASPs) bağlanarak antikordan bağımsız şekilde komplemanı aktifler (101, 102). MASPs ailesi; MASP-1, MASP-2, MASP-3 ve MBL ilişkili 19 kDa'luk bir protein olan MAp19'dan (MBL-associated protein of 19 kDa) oluşmaktadır. MASP-2'nin immün yanıtta önemli bir rolü olduğuna dair görüş birliği vardır. MASP-1 de lektin yolunun aktivasyonunda yer almaktadır. MASP-3 ve MAp19'un rolleri çok az bilinmektedir (91, 102-104). MBL mikroorganizmaların hücre duvarlarında mannoz ve N-asetilglukozamin terminalleri içeren glikoproteine kalsiyum varlığında bağlanır. Patojene bağlanmadan sonra MBL-MASP-2 kompleksi ya direkt opsonofagositoza ya da kompleman aktivasyonuna aracılık eder (93, 98).

MBL plazma konsantrasyonu <5 ng/ml'den >5000 ng/ml'ye; 1000 kata kadar değişebilmektedir (87, 105, 106). Bu değişkenlik MBL-2 geninin ekson 1'deki tek nukleotid polimorfizmi ile açıklanmaktadır (87, 98, 106). Mutasyonlar MBL konsantrasyonlarında anlamlı azalmalarla sonuçlanmaktadır (107, 108). Dolaşımdaki MBL seviyelerini mutasyonların etkilediği tartışmasızdır ancak genetik olmayan etkiler de mevcuttur. Akut faz proteini olan MBL enfeksiyon ya da cerrahi travmadan sonra 3 kata kadar yükselebilmektedir (109).

MBL eksikliği immünsupresif bireylerde artmış enfeksiyon oranlarıyla ilişkili iken; MBL yüksekliği de böbrek naklinde zayıf greft sağkalımı ve ciddi rejeksiyonla ilişkili görünmektedir (87, 107, 110).

MBL EKSİKLİĞİ

MBL eksikliği ve hastalık arasındaki ilişkiyi gösteren ilk vaka 1968'de bildirilmiştir. Küçük bir kız çocuğunda antibiyotik ve steroid tedavisine yanıtızsız ciddi dermatit, diyare ve tekrarlayıcı bakteriyel enfeksiyonlar raporlanmıştır. Hematolojik incelemelerde polimorfonuklear lökositler tarafından *Staphylococcus aureus*, pirinç nişastası ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin maya partiküllerinin fagositozunda defekt olduğu gözlenmiştir. Aynı fagositik defektin hastanın bazı yakın akrabalarında da bulunduğu gözlenmiş ve genetik temelli olduğuna karar verilmiştir. Daha sonra bu genetik defekt MBL genindeki bir polimorfizm olarak tanımlanmıştır (94).

MBL eksikliği ve düşük MBL düzeyleri, insan MBL genindeki ekson 1'in 52, 54 ve 57. kodonlarındaki üç yanlış anlamlı mutasyon ile kuvvetli biçimde ilişkili bulunmuştur (97, 98, 111). Bu mutasyonlar MBL multimerizasyonunda bozulmaya, ligand bağlanmasında azalmaya ve komplemanın aktive olmamasına neden olur (98). Çalışmalar düşük MBL seviyelerine sıkça rastlandığını göstermiştir (97, 112). MBL eksikliği hem çocuk hem de erişkinlerde tekrarlayan enfeksiyonlarla ilişkili bulunmuştur (93, 113-115). Klinik organ naklinde, MBL iki ucu keskin bıçak gibidir; düşük MBL seviyelerinin enfeksiyon riskinde artış, yüksek seviyelerin ise nakil reddiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (85, 110, 116, 117).

MBL eksikliği ve enfeksiyonlar arasındaki ilişki, farklı çalışma gruplarında bir çok araştırmacı tarafından incelenmiş; bakteriyel enfeksiyon

sıklığı, şiddeti, yüksek mortalite oranlarıyla ilişkili olabileceği saptanmıştır (94, 95, 114, 118).

MBL, ekme mayasının bir opsonini olarak bulunmuş ve AIDS hastalarında *Cryptosporidium parvum* diyaresiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. MBL, klinik izolatlarda *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'a bağlanabilmektedir. Farklı çalışmalarda düşük MBL seviyelerine neden olan MBL mutasyonlarıyla kronik nekrotizan pulmoner aspergillozu ve *Plasmodium falciparum* sıtması arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (119).

Çeşitli çalışmalarda organ nakli yapılmış hastalarda düşük MBL seviyeleri enfeksiyon sıklığında artma ve iyi greft gidişi ile ilişkili olduğu saptanırken bazı çalışmalarda düşük MBL seviyeleri ve iyi greft gidiş arasında ilişki bulunamamıştır (85, 103, 117).

Böbrek nakil hastalarında greft sağkalımı ve MBL seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada; yüksek MBL seviyelerinin greft kaybı için bağımsız bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (110).

MBL EKSİKLİĞİNİN SAPTANMASI

Mannoz bağlayıcı lektin eksikliği 3 yöntemle saptanabilmektedir (84, 93).

1. Serum/Plazma MBL ölçümleri
2. MBL genotipleme
3. Fonksiyonel MBL ölçümleri

Serum/Plazma MBL Ölçümleri

MBL ölçümlerinde, yüksek molekül ağırlıklı (doğal tip) MBL'nin ölçümleri için çoğunlukla enzim bağlı katı faz yöntemi (enzyme-linked immünosorbent assay, ELISA) tercih edilmektedir. MBL fonksiyonuyla mükemmel bir uyum sağlar. Mannan kaplı mikroplaklar kullanılarak örnekler çalışılır, spektrofotometrik olarak değerlendirilir ve kantitatif bir sonuç elde edilir (84, 93).

MBL Genotipleme

MBL genotipleme, genetik yapı hakkında net ve temel bilgi sağlamaktadır. Bu yaklaşımın dezavantajı; 7 haplotipiyle MBL fonksiyonu oldukça değişken olmasıdır (84).

Fonksiyonel MBL Ölçümleri

MBL'nin durumu fonksiyonel olarak ölçülebilir. Bunun için MBL-MASP kompleks aktivitesi ya da MBL yolak testleri tanımlanmıştır. Bu testlerle MBL'nin başlattığı kompleman yolağın aktivasyonu ölçülmektedir. Klinik tanıda bu testler ilk tercih olurken, yüksek kaliteli ve iyi saklanmış materyal gerektirmeleri araştırmalarda kullanılmaları için dezavantajdır (84).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'nın B.30.2.PAÜ.0.01.00.00-200/738 sayılı izniyle Nisan 2009-Haziran 2009 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi Organ Nakli Birimince takip edilen 65 böbrek nakil alıcısı ve 25 böbrek vericisinden toplanan 90 örnek çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya katılanların cinsiyetleri, alıcı ya da verici olmaları, naklin canlı ya da kadavradan olması kaydedildi. CMV antijenemi (1≤ hücre pozitif kabul edildi), CMV PCR, BK PCR, JC PCR sonuçları, idrar kültürlerinde üreme olup olmadığı retrospektif olarak kayıtlardan tarandı. Bu testleri çalışılmayan hastalar değerlendirme dışı bırakıldı.

Çalışmaya katılan 90 kişiden etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere 2 cc periferik venöz kan alındı ve hemen ardından 4200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek plazmanın ayrılması sağlandı. Ayrılan plazmalar her hasta için iki farklı ependorfa alındı; biri MBL ELISA çalışılmak üzere -80°C'de saklandı. Diğer ependorftaki plazmadan aynı gün içinde DNA elde edildi ve elde edilen DNA'lar TLR4 polimorfizmi çalışılana kadar -20°C'de saklandı.

DNA ELDESİ

Ayrılan plazmalardan DNA eldesi "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche®) ticari kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı:

1. 1.5 ml'lik ependorf tüplere 200 µl plazma örneği alındı.

2. Üzerlerine 200 µl bağlama tamponu (binding buffer) ve 40 µl Proteinase K eklenerek iyice karıştırıldı.
3. 10 dk 70°C'de inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Örnek sayısı kadar toplama (collection) tüpü alındı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi.
6. Hazırlanan karışım toplama tüplerine aktarıldı. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör ayırıcı tampon (removal buffer) eklendi. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) eklendi. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu eklendi. 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13000 g'de 10 saniye santrifüj yapıldı.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1.5 ml'lik ependorflara alındı.
15. Her tüpe önceden 70°C'de bekleyen elüsyon tamponundan 200 µl eklendi.
16. 8000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
17. Filtreli tüpler atıldı. DNA'lar ependorfta kaldı.

Elde edilen DNA'lar "Real-Time PCR" çalışılana kadar -20°C'de saklandı.

"Real-Time PCR" ile TLR4 Polimorfizmlerinin Saptanması

TLR4 polimorfizmleri LightCycler 2.0 (Roche®) cihazında, -20°C'de saklanan DNA'lar oda ısısına getirildikten sonra çalışıldı.

TLR4 polimorfizmleri bir set primer ve hibridizasyon probu kullanılarak çalışıldı. Thr399Ile SNPs'ı saptamak için kullanılan primerler ve proplar TibMol Biol® (Mannheim, Almanya) firmasına sentez ettirildi (Tablo-1) (120). Asp299Gly SNPs'ı saptamak için TibMol Biol® (Mannheim, Almanya) firmasından satın alınan "rs4986790 hu TLR4 LightSNiP" kullanıldı (33).

Tablo-1: İnsan TLR4 Thr399Ile SNPs'ı saptamak için kullanılan primer ve proplar

TLR4 primerleri

5' GTTTAGAAGTCCATCGTTTG-3' (forward)

5' TAAGCCCAAGAAGTTTGAA-3' (reverse)

Thr399Ile hibridizasyon propları

CTTGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTCAAAG-fluorescein

LC Red705-ATTTTGGGACAACCAGCCTAAAGTAT

Final volüm 20 µl olacak şekilde; 5 µl genomik DNA ve 15 µl reaksiyon karışımı (Tablo-2 ve Tablo-3) kullanılarak PCR reaksiyonu ve erime eğrisi

“melting curve”, LightCycler kapilerinde gerçekleştirildi (Roche Diagnostics). Kurşunlu kapilerler santrifüj edildi ve LightCycler cihazının çemberine yerleştirildi. PCR döngüleri tablo 4 ve 5 de gösterildiği şekilde belirlendi. Verilerin analizi için erime eğrisi programı kullanıldı. Erime eğrisi analizi ile çalışılan örnekler; homozigot mutant, heterozigot mutant, homozigot doğal tip olarak belirlendi (şekil 1-5).

Tablo-2: Thr399Ile polimorfizminin araştırılmasında hazırlanan PCR karışımı

PCR Karışımı	Miktar
dH ₂ O	3,4 µl
Mg ⁺² (25mM)	1.6 µl
Primer 1(forward) (5mM)	2 µl
Primer 2 (reverse) (5mM)	2 µl
FL (Floresan) prob (2mM)	2 µl
LC (Lightcycler) prob (2mM)	2 µl
Master mix	2 µl
DNA	5 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo-3: Asp299Gly polimorfizminin araştırılmasında hazırlanan PCR karışımı

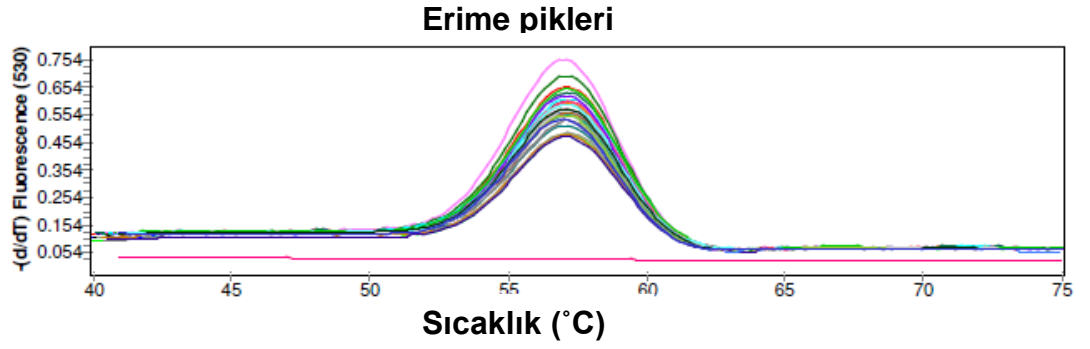
PCR Karışımı	Miktar
H ₂ O	10,4 µl
Reagent Mix	1 µl
FastStart DNA Master	2 µl
MgCl ₂	1.6 µl
DNA	5 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo-4: Asp299Gly polimorfizmi için PCR döngüsü

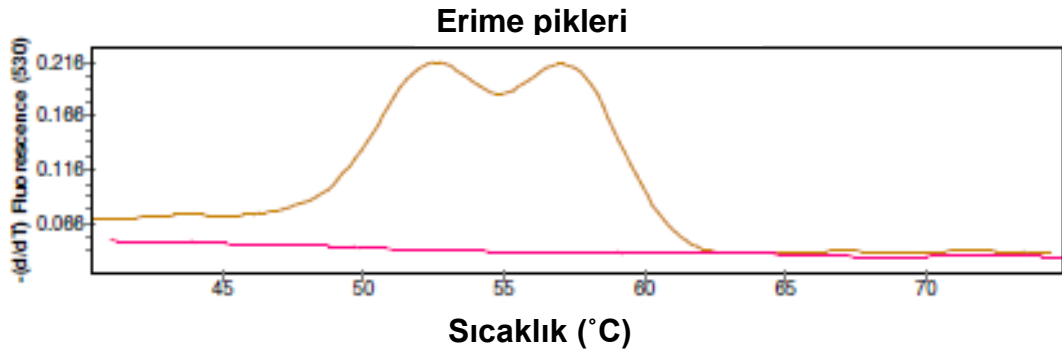
Bozulma	95°C	30 dakika (dk)	
Çoğalma	95°C	10 saniye (sn)	} 45 döngü
	60°C	10 sn	
	72°C	45 sn	
Erime	95°C	30 sn	
	40°C	2 dk	
	75°C	-	
Soğuma	40°C	30 sn	

Tablo-5: Thr399Ile polimorfizmi için PCR döngüsü

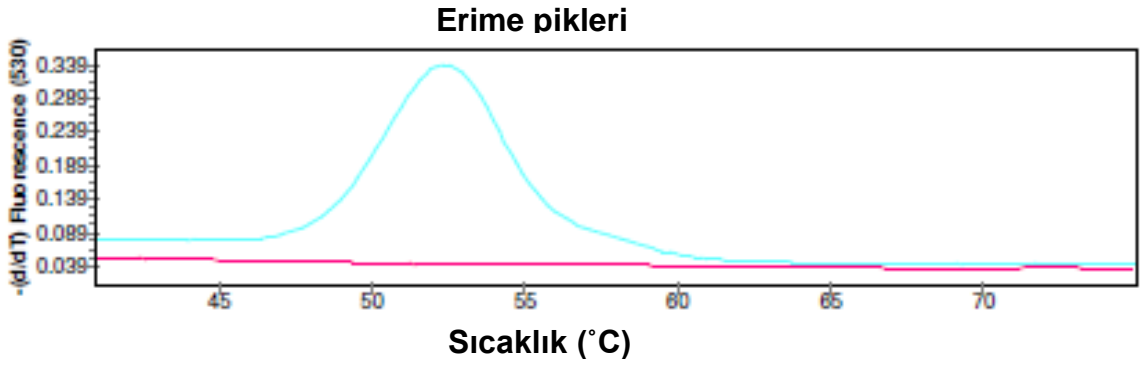
Bozulma	95°C	10 dk	
Çoğalma	95°C	10 sn	} 50 döngü
	50°C	10 sn	
	72°C	20 sn	
Erime	95°C	-	
	40°C	30 sn	
	85°C	-	
Soğuma	40°C	30 sn	



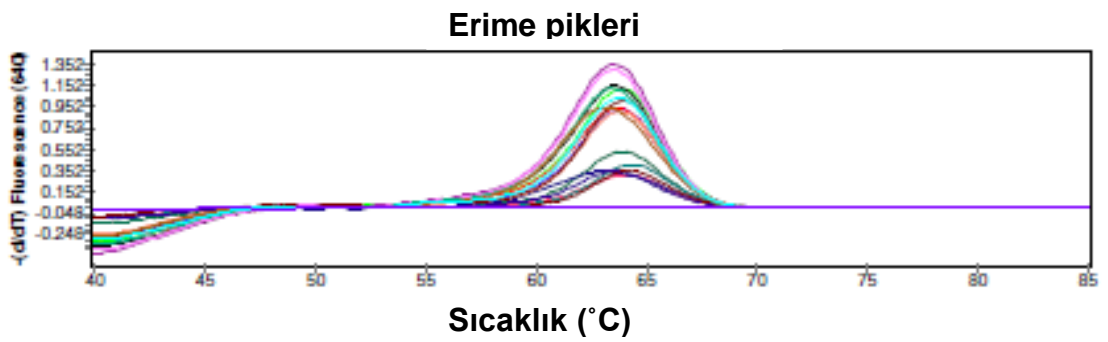
Şekil-1: Asp299Gly doğal tip



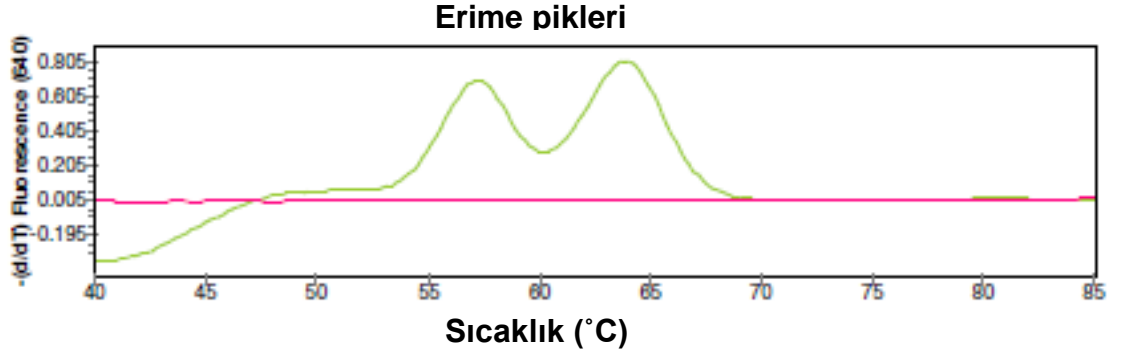
Şekil-2: Asp299Gly heterozigot mutant



Şekil-3: Asp299Gly homozigot mutant



Şekil-4: Thr399Ile doğal tip



Şekil-5: Thr399Ile heterozigot mutant

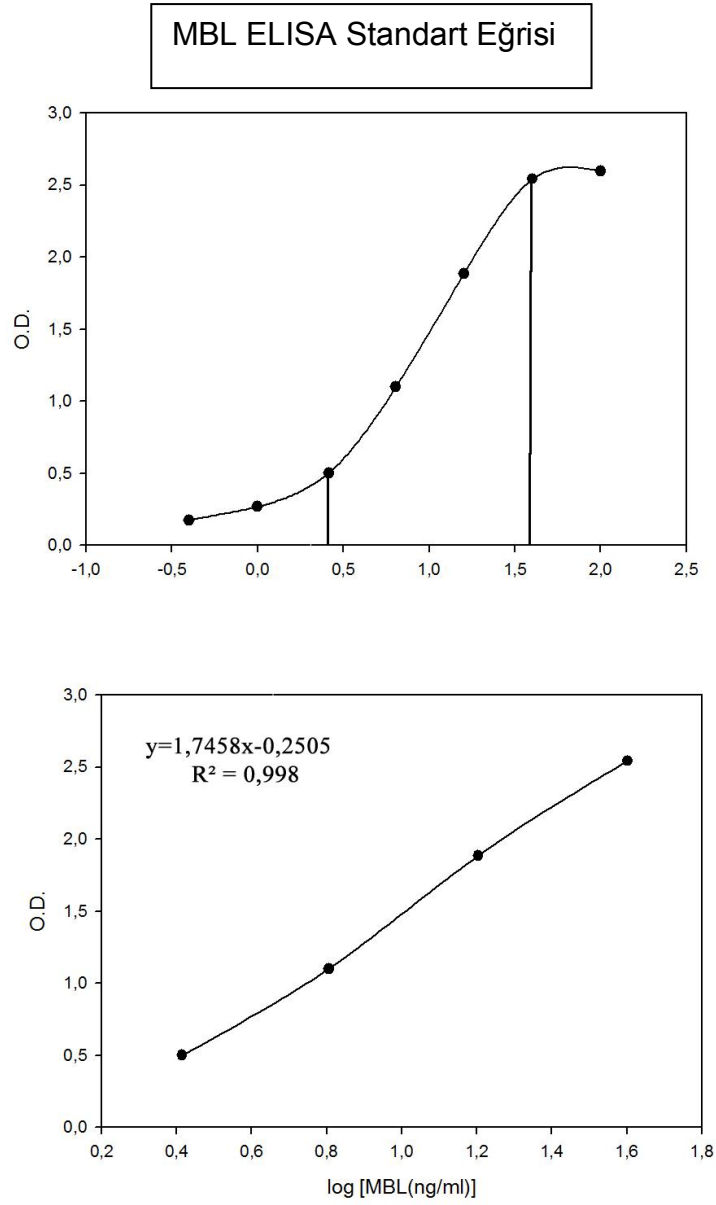
MBL DEĞERLERİNİN ELISA İLE ÖLÇÜLMESİ

Çalışma gününe kadar -80°C'de saklanan plazma örnekleri oda ısısına getirildikten sonra Hycult Biotech'den temin edilen ticari kit ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda belirtildiği gibi çalışıldı:

1. Mikrotitrasyon plağındaki kuyucuklara 150 µl seyreltilmiş plak aktivasyon tamponu konuldu.
2. Üzeri yapışkan kapayıcıyla kapatılıp 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
3. Mikrotitrasyon plağı 4 kez, 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı.
4. Mikrotitrasyon plağına 8 standart solüsyon ve örneklerden 100 µl konuldu.
5. Üzeri yapışkan kapayıcıyla kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Mikrotitrasyon plağı 4 kez, 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µl seyreltilmiş işaretçi (tracer) konuldu.
8. Üzeri yapışkan kapayıcıyla kapatılıp oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
9. Mikrotitrasyon plağı 4 kez, 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı.

10. Her kuyucuğa 100 µl seyreltilmiş “streptavidin-peroxidase” çözeltisi konuldu.
11. Üzeri yapışkan kapayıcıyla kapatılıp oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
12. Mikrotitrasyon plağı 4 kez, 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı.
13. Her kuyucuğa 100 µl TMB (tetramethylbenzidine) substrat konuldu.
14. Üzeri yapışkan kapayıcıyla kapatılıp oda ısısında 10-30 dakika inkübe edildi.
15. Her kuyucuğa 100 µl durdurma çözeltisi (stop solution) konularak reaksiyon sonlandırıldı.

Durdurma çözeltisi konulduktan sonra mikrotitrasyon plağı 30 dakika içinde Biotek® Elx 808 ELISA okuyucusunda 450 nm’de okutuldu. Absorbans değerlerinin grafiği çizilerek, bu grafiğin denklemiyle MBL konsantrasyonları hesaplandı (şekil-6).



Şekil-6: MBL ELISA Standart Eğrisi ve Absorbans Değer Grafiği

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma verilerinin değerlendirilmesi "SPSS for Windows Ver.16.0" paket programı kullanılarak yapıldı. TLR4 polimorfizmi, MBL eksikliği ve

bunların örnek alınan kişilerin özelliklerine göre dağılımında yüzde ve farklılığın saptanmasında, ki-kare (χ^2) testleri (Pearson chi square, devamlılık düzeltmesi, fisher'in kesin χ^2 testi) kullanıldı. p değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi Organ Nakli Biriminde takip edilen 65 böbrek nakil alıcısı ve 25 böbrek vericisinden Nisan 2009-Haziran 2009 tarihleri arasında toplanan 90 örnek çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınan örneklerin 43'ü (%47.7) kadınlardan, 47'si (%52.2) erkeklerden toplandı. Böbrek alıcılarından 19'una (%29,2) kadavradan, 46'sında (%70.3) canlı vericiden nakil yapılmıştı. Katılımcıların yaşları 20 ile 73 arasında olup ortalaması 43.5 ± 12.8 olarak bulundu.

Thr399Ile polimorfizmi incelenen örneklerin 5'i (%5.6) mutasyon saptama aşamalarının tekrarlanmasına rağmen sonuç alınmadığı için çalışma dışı bırakıldı. Değerlendirmeye alınan örneklerin 83'ü (%97.6) Thr399Ile doğal tip (Thr-DT), 2'si (%2.4) heterozigot mutant (Thr-HM) bulundu. Thr399Ile homozigot mutant bulunmadı.

Asp299Gly polimorfizmi incelenen örneklerin, 84'ü (%93.3) Asp299Gly doğal (Asp-DT) tip, 4'ü (%4.4) Asp299Gly heterozigot (Asp-HM) ve 2'si (%2.2) Asp299Gly homozigot (Asp-HOM) olmak üzere 6'sı (%6.6) mutant bulundu.

Örneklerin 2'si (%2.2) hem Thr399Ile heterozigot hem de Asp299Gly heterozigot mutant (cosegregation, eş ayrışım mutasyonu) olarak saptandı ve Thr399Ile polimorfizmlerin hepsi Asp299Gly ile birlikte bulundu.

Çalışmaya dahil edilen örneklerin 31'inin (%34.4) plazma MBL değeri 400 ng/ml'den küçük, 59'unun (%65.5) 400 ng/ml'den büyük bulundu.

Böbrek verici ve alıcısı arasında TLR4 polimorfizmleri için anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Alıcıların %3.2'sinde Thr399Ile heterozigot polimorfizmi saptanırken vericilerde hiç gözlenmedi. Asp299Gly polimorfizmi alıcıların %9.3'ünde bulundu (%6.2 heterozigot ve %3.1 homozigot form), vericilerde saptanmadı. Hem Thr399Ile hem de Asp299Gly polimorfizmlerinin hepsi alıcılarda saptandı. Vericilerde Thr399Ile ve Asp299Gly mutasyonları gözlenmedi. Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi alıcılarda %9.2 olarak saptandı. Verici ve alıcılardaki plazma MBL seviyesi arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Plazma MBL seviyesi alıcıların %33.8 ve vericilerin %36.0'sında 400 ng/ml'den küçük bulundu

Thr399Ile heterozigot mutasyonları (Thr-HM) canlı vericiden nakil yapılan alıcıların %2.3'ünde, kadavradan nakil yapılanların ise %5.6'sında saptandı. Asp299Gly polimorfizmi vericisi canlı olan hastaların %8.6'sında (%4.3 heterozigot, %4.3 homozigot form) bulundu. Asp299Gly homozigot mutasyonların hepsi vericisi canlı olan örneklerde saptandı. Kadavra kaynaklı nakillerde %10.5 Asp299Gly heterozigot mutasyon tespit edildi. Canlı vericiden nakil olan katılımcıların %34.8'i ve kadavradan nakil olanların %31.6'sında plazma MBL seviyeleri 400 ng/ml'nin altında bulundu.

TLR4 polimorfizmlerinde kadın ve erkek cinsiyeti arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Erkeklerin %4.5'inde Thr399Ile heterozigot polimorfizm saptanırken, kadınlarda saptanmadı. Thr399Ile homozigot mutant her iki cinsiyette de saptanmadı. Erkeklerin %8.6'sında Asp299Gly polimorfizmi (%4.3 heterozigot, %4.3 homozigot form) bulunurken, kadınların %4.7'sinde heterozigot form tespit edildi. Homozigot form kadınlarda

bulunmadı. Plazma MBL değerleri kadınlarda erkeklere oranla anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.05$) (Tablo-6, Tablo-7).

Tablo-6: TLR4 Thr399 ile polimorfizmini katılımcıların çeşitli özelliklerine göre dağılımı

	Thr-HM n (%)	Thr-DT n (%)
Alıcı (n=62)	2 (3.2)	60 (96.8)
Verici (n=23)	0 (0.0)	23 (100)
Erkek (n=44) (Toplam populasyon)	2 (4.5)	42 (95.5)
Kadın (n=41) (Toplam populasyon)	0 (0.0)	41 (100)

Tablo-7: TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyesinin katılımcıların çeşitli özelliklerine göre dağılımı

	Asp299Gly			MBL	
	Asp-HOM n (%)	Asp-HM n (%)	Asp-VT n (%)	≤400 ng/ml n (%)	≥400 ng/ml n (%)
Alıcı (n=65)	2 (3.1)	4 (6.2)	59 (90.8)	22 (33.8)	43 (66.2)
Verici (n=25)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100)	9 (36.0)	16 (64.0)
Erkek (n=47) (Toplam populasyon)	2 (4.3)	2 (4.3)	43 (91.5)	11 (23.4)	36 (76.6)
Kadın (n=43) (Toplam populasyon)	0 (0.0)	2 (4.7)	41 (95.3)	20 (46.5)	23 (53.5)

TLR4 polimorfizmleri ve CMV antijenemi pozitifliği arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). CMV antijenemi testi pozitif olanlarda Thr399Ile polimorfizmlerine rastlanmaz iken negatif olanların %4.4'ünde Thr399Ile heterozigot polimorfizm bulundu. CMV antijenemi testi pozitif olanların hiçbirinde Asp299Gly polimorfizmi tespit edilmedi. CMV antijenemi testi negatif olan katılımcıların %12.5'inde Asp299Gly polimorfizmi saptandı (%8.3 heterozigot, %4.2 homozigot form). MBL seviyeleri ve CMV antijenemi pozitifliği değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Plazma MBL seviyeleri, CMV antijenemi testi pozitif katılımcıların %28.6'sında, negatif katılımcıların %35.4'ünde 400 ng/ml'den küçük bulundu.

TLR4 polimorfizmleri ile CMV PCR testi sonuçları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). CMV PCR testi pozitif olan örneklerin %2.9'unda, negatif olanların %3.7'sinde Thr399Ile heterozigot polimorfizmi saptandı. Asp299Gly polimorfizm, CMV PCR sonucu pozitif çıkan katılımcıların %5.3'ünde (heterozigot) bulunur iken negatif olanların %14.8'inde (%7.4 heterozigot, %7.4 homozigot form) gözlendi. Asp299Gly homozigot formun hepsi CMV PCR testi negatif olan katılımcılarda saptandı, pozitif PCR sonucu olanlarda gözlenmedi. Plazma MBL seviyeleriyle CMV PCR test sonuçları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). MBL seviyeleri, CMV PCR sonucu pozitif örneklerin %34.2'sinde, negatif olan örneklerin %33.3'ünde, 400 ng/ml'den küçük bulundu.

TLR4 polimorfizmleri ve plazma MBL seviyeleri BK virus PCR sonuçlarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Thr399Ile heterozigot polimorfizmi, BK virus PCR sonucu pozitif olanlarda saptanmaz iken, negatif olan katılımcıların %5.6'sında bulundu. PCR sonucu pozitif olan örneklerin %3.7'sinde Asp299Gly heterozigot form bulunurken, negatif olan örneklerin %12.9'unda Asp299Gly polimorfizmi (%10.3 heterozigot form, %2.6 homozigot form) tespit edildi. Asp299Gly homozigot form PCR sonucu pozitif olan hastalarda saptanmadı. BK virus PCR

sonuçları pozitif olan katılımcıların %37.0'ında, negatif olan katılımcıların %33.3'ünde plazma MBL seviyeleri 400 ng/ml'den küçük olarak bulundu.

TLR4 polimorfizmleri ve plazma MBL seviyeleri JC virus PCR sonuçlarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). JC virus PCR sonucu pozitif bulunanların %3.8'inde, negatif bulunan katılımcıların %2.8'inde Thr399Ile heterozigot polimorfizm saptandı. Asp299Gly polimorfizmi, PCR sonucu pozitif olan örneklerin 14.3'ünde (%10.7 heterozigot, %3.6 homozigot form) bulunurken negatif örneklerin %5,2'sinde (%2.6 heterozigot form, %2.6 homozigot form) saptandı. Plazma MBL seviyelerinin, PCR sonuçları pozitif olan katılımcıların%35.7'sinde, negatif olanların %34.2'sinde 400 ng/ml'nin altında olduğu saptandı (Tablo-8, Tablo-9)

Tablo-8: TLR4 Thr399Ile polimorfizminin katılımcıların test sonuçlarına göre dağılımı

		Thr-HM n (%)	Thr-DT n (%)
CMV antijenemi (n=59)	Pozitif (n=14)	0 (0.0)	14 (100)
	Negatif (n=45)	2 (4.4)	43 (95.6)
CMV PCR (n=62)	Pozitif (n=35)	1 (2.9)	34 (97.1)
	Negatif (n=27)	1 (3.7)	26 (96.3)
BK PCR (n=62)	Pozitif (n=26)	0 (0.0)	26 (100)
	Negatif (n=36)	2 (5.6)	34 (94.4)
JC PCR (n=62)	Pozitif (n=26)	1 (3.8)	25 (96.2)
	Negatif (n=36)	1 (2.8)	35 (97.2)

Tablo-9: TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyesinin katılımcıların test sonuçlarına göre dağılımı

		Asp299Gly			MBL	
		Asp-HOM n (%)	Asp-HM n (%)	Asp-DT n (%)	MBL ≤ 400 ng/ml n (%)	MBL ≥ 400 ng/ml n (%)
CMV antijenemi (n=62)	Pozitif (n=14)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (100)	4 (28.6)	10 (71.4)
	Negatif (n=48)	2 (4.2)	4 (8.3)	42 (87.5)	17 (35.4)	31 (64.6)
CMV PCR (n=65)	Pozitif (n=38)	0 (0.0)	2 (5.3)	36 (94.7)	13 (34.2)	25 (65.8)
	Negatif (n=27)	2 (7.4)	2 (7.4)	23 (85.2)	9 (33.3)	18 (66.7)
BK PCR (n=66)	Pozitif (n=27)	1 (3.7)	0 (0.0)	26 (96.3)	10 (37.0)	17 (63.0)
	Negatif (n=38)	1 (2.6)	4 (10.3)	34 (87.2)	13 (33.3)	26 (66.7)
JC PCR (n=66)	Pozitif (n=28)	1 (3.6)	3 (10.7)	24 (85.7)	10 (35.7)	18 (64.3)
	Negatif (n=38)	1 (2.6)	1 (2.6)	36 (94.7)	13 (34.2)	25 (65.8)

Üriner sistem enfeksiyonları idrar kültüründe üreme olup olmasına göre değerlendirildi. TLR4 polimorfizmi, plazma MBL seviyeleri ile kültür sonuçları karşılaştırıldı. Kültüründe üreme olanların hiçbirinde Thr399 ile polimorfizmi bulunmazken, üreme olmayan örneklerin %2.0'ında heterozigot form saptandı. Asp299Gly polimorfizmi kültüründe üreme olanların %9.4'ünde (heterozigot form) bulunur iken, üreme olmayan katılımcıların %3.8'inde (%1.9'unda heterozigot form, %1.9'unda homozigot form) saptandı. İdrar kültüründe üreme olan örneklerin hiçbirinde Asp299Gly homozigot polimorfizme rastlanmadı. Plazma MBL seviyeleri, kültüründe üreme olan örneklerin %34.4'ünde, olmayanların %30.8'inde, 400 ng/ml'den düşük olarak saptandı (Tablo-10, Tablo-11).

Tablo-10: TLR4 Thr399Ile polimorfizminin idrar kültür sonuçlarına göre dağılımı

	Thr-HM n (%)	Thr-DT n (%)
İdrar kültüründe üreme var (n=31)	0 (0.0)	31 (100)
İdrar kültüründe üreme yok (n=49)	1 (2.0)	48 (98.0)

Tablo-11: TLR4 Asp299Gly polimorfizmi ve MBL seviyelerinin idrar kültür sonuçlarına göre dağılımı

	Asp299Gly			MBL	
	Asp-HOM n (%)	Asp-HM n (%)	Asp-DT n (%)	MBL ≤ 400 ng/ml n (%)	MBL ≥ 400 ng/ml n (%)
İdrar kültüründe üreme var (n=32)	0 (0.0)	3 (9.4)	29 (90.6)	11 (34.4)	21 (65.6)
İdrar kültüründe üreme yok (n=52)	1 (1.9)	1 (1.9)	50 (96.2)	16 (30.8)	36 (69.2)

Kültürde üremesi olan Asp299Gly heterozigot mutant örneklerin %100'ünde *Escherichia coli* üremesi vardı. Bunlardan %33.3'ü saf *E.coli* iken, %66.6'sı çoklu etkenli enfeksiyondü. Asp299Gly doğal tip örneklerin %6.9'unda etken gram negatif dışı mikroorganizmalar iken, %93.1'inde mutlaka en az bir gram negatif etken vardı ve bunların %66.6'sında da etkenlerden biri *E.coli* idi. Kültürde üremesi olan MBL değerleri 400 ng/ml'den küçük örneklerin %9.1'inde gram negatif dışı mikroorganizmalar saptanırken, %90.9'unda en az bir gram negatif etken saptandı. Bunların da %80'inde etkenlerden biri *E.coli* idi. Kültürü pozitif olan MBL seviyeleri 400 ng/ml'den büyük örneklerin %4.8'inde gram negatif olmayan mikroorganizma gözlenirken, %95.2'sinde en az bir gram negatif etken gözlemlendi. Bunların %75'inde etkenlerden biri *E.coli* idi.

TARTIŞMA

Doğal immün yanıt; konağın patojen olanı ayırmasına olanak tanımakta, sitokinler ve kemokinlerin üretimini, nitrik oksit (NO) gibi efektör moleküllerin işlenmesini içeren hızlı bir inflamatuar yanıt sağlamakta ve edinsel immünite ile etkileşmektedir. Doğal immünitenin moleküler düzeyde anlaşılması 1990'ların ortalarında *Drosophila* "Toll proteini"nin, kanatlıları fungal enfeksiyonlara karşı korumada önemli rolü olabileceğinin gösterilmesiyle hızlanmıştır. Bu gözlem memeli hücrelerinde bulunan TLRs olarak isimlendirilen benzer proteinlerin tanımlanmasının yolunu açmıştır. Bu güne kadar en az 13 TLRs tanımlanmıştır. TLRs çeşitli mikrobiyal molekülleri tanıyıp, yanıt vermekte, doğal immün sistemin patojen gruplarını ayırt etmesine olanak sağlamakta ve efektör yanıt kaskadını indüklemektedir. TLR ailesinin tümü, konağın birçok mikrobiyal patojen tarafından oluşturulan enfeksiyonu saptamasını sağlamaktadır (14,15,49,121).

TLR ailesinin muhtemelen en iyi bilinen üyesi olan TLR4 sadece gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerini tanımak için değil, aynı zamanda *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* ve *Candida albicans*'ın diğer mikrobiyal PAMPs'lerini de tanımak için de temel reseptördür. Eksojen ligandların yanı sıra son çalışmalar ısı şok proteini 60, fibrinojen, fibronektin, hiyalüronik asit gibi endojen moleküllerin de TLR4 aracılığıyla proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyebileceğini göstermiştir (20, 50).

İnsanda oluşan hastalıklarda TLR'nin rolüne ait bilgiler TLR genlerinde polimorfizm olan kişilerin incelenmesine dayanmaktadır (122). En sık görülen mutasyon tipi SNP'dir. Bir ya da iki alternatif baz popülasyonunda ölçülebilir sıklıkta (>%1) bulunmaktadır. Çalışmalar özgül TLRs'lerdeki genetik varyasyonların farklı patojenlere ve enfeksiyöz olmayan hastalıklara yatkınlığı

arttırdığını düşündürmüştür (71, 121). Arbour ve ark. reseptörün ekstraselüler domaininde amino asit değişikliğine yol açan ve işlevsel sonuçları olan iki (Asp299Gly ve Thr399Ile) SNP bulmuştur. Bu polimorfizmlerin solunum ile alınan LPS'e immünolojik yanıtın ve proinflamatuvar sitokinlerin, akut faz reaktanlarının, çözünebilir adezyon moleküllerinin seviyelerinin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir (73). Michel ve ark. Belçika ve İsveçli katılımcılarla yaptıkları çalışmada Asp299Gly polimorfizmi ile solunum ile LPS alınmasının arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlar. Asp299Gly heterozigot bireylerde solunum ile LPS alınmasına yanıtın azaldığını saptamışlar (123). TLR4 polimorfizmleri ve fonksiyonel etkileri hakkında tam bir görüş birliği yoktur. Yapılan farklı çalışmalarda TLR4 polimorfizmi olan bireylerde LPS sinyalinde eksiklik olmadığı da gösterilmiştir (79,124). Van der Graaf ve ark. mononükleer hücreleri eksojen ve endojen TLR4 ligandlarıyla uyarmışlardır. Asp299Gly polimorfizminin hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokinleri etkilemediğini göstermişlerdir (50).

TLR4 mutasyonları ile gram negatif enfeksiyonlar arasında ilişki olduğunu destekleyen çok sayıda çalışma vardır. New Jersey'de yapılan bir çalışmada TLR4 mutasyonu (Asp299Gly ve Thr399Ile) cerrahi yoğun bakım hastalarında %18, sağlıklı gönüllülerde %13 saptanmıştır. Yoğun bakım hastalarında TLR4 mutasyonu olanlarda, olmayanlarla kıyaslandığında gram negatif enfeksiyon oranları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Mutasyon olanlarda tüm nedenlerden mortalite oranlarının mutasyon olmayanlara göre artma eğiliminde olduğu belirtilmiştir (70).

Yoğun bakımda yatan septik şoklu hastalarda yapılan bir başka çalışmada Asp299Gly ya da Thr399Ile polimorfizmi hastaların %12'si ve sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunun %11'inde saptanmıştır. Septik şok hastalarında Asp299Gly'nin tek başına mutasyonu gözlenmişken, kontrol grubunda gözlenmemiştir. Gram negatif mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar doğal tip TLR4 ya da Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi taşıyan

hastaların %35'inde bulunmuşken, sadece Asp299Gly polimorfizmi olan hastalarda %80 oranında bulunmuştur. Hem Asp299Gly hem de Thr399Ile polimorfizmi olan hastalarda en sık gözlenen enfeksiyon menenjit olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada verilerden yola çıkarak 299 lokalizasyonunda meydana gelen mutasyonun TLR4 fonksiyonu üzerine daha ciddi etkisi olduğunu bildirmişlerdir. TLR4 Asp299Gly homozigot olarak saptadıkları tek hastanın *Escherichia coli* piyelonefritinden öldüğünü belirtmişlerdir (125).

Montes ve ark. (126) akut ve kronik osteomyelitlilerden oluşan 80 hasta ve 155 kan bankası donöründe TLR4 polimorfizmini çalışmışlardır. Osteomyelitli hastalarda homozigot Asp299Gly polimorfizmini kontrollere göre anlamlı olarak daha sık bulmuşlardır. Asp299Gly polimorfizmi olanların hepsinde aynı zamanda Thr399Ile polimorfizminin de olduğunu saptamışlardır. Thr399Ile polimorfizmi için heterozigot ya da homozigot sıklığı osteomyelitli hastalar ve kontroller arasında farklılık göstermediği belirtilmiştir. TLR4 mutasyonu ve klinik arasındaki uyumu saptadıktan sonra etkenleri incelediklerinde; Asp299Gly heterozigot ya da homozigot olanların, polimorfizm olmayanlara göre gram negatif bakterilerle daha fazla enfekte oldukları bulunmuş ve bu polimorfizmin gram-negatif osteomyelit için risk faktörü olduğu belirtilmiştir.

Feterowski ve ark. (127) cerrahi yoğun bakımdaki sepsisli hastaları kapsayan çalışmalarında; hastaların %95'inin Asp299Gly doğal tipte olduğunu, %5'inin mutasyon taşıdığını saptamışlardır. Mutasyonların tamamı heterozigot olarak belirlenmiş, homozigot mutasyona rastlanmamıştır. Sonuçları; Asp299Gly mutasyonunun genellikle polimikrobiyal enfeksiyonların neden olduğu sepsis gelişimi ve bunların sonuçlarıyla da ilişkili olmadığını göstermiştir.

Çin popülasyonunda Gao ve ark. (128) yaptıkları bir çalışmada pankreatik nekrotik enfeksiyonu olan akut pankreatitli hastalarda ve sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunda Asp299Gly polimorfizmini çalışmışlardır. Nekrozlu akut pankreatiti olan 115 hastanın % 29.6'inde heterozigot mutasyon saptanırken, % 70.4'ünün doğal tip olduğu bulunmuştur. Homozigot mutasyon saptamamışlardır. Bakteriyoloji sonuçlarına göre gram negatif aerobik bakteri enfeksiyonları fazla gözlenmiş, en sık gözlenen patojen olarak *Escherichia coli*'yi tespit etmişlerdir. Akut pankreatitli hastalardan mutasyon olanlarda gram negatif enfeksiyona bağlı mortalite oranını, mutasyon olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlar ve akut pankreatitli hastalarda TLR4 mutasyonunun gram negatif bakteri enfeksiyonu için potansiyel bir risk faktörü olduğu düşünülmüştür.

Read ve ark. (129) daha kapsamlı bir çalışmada *N.meningitidis*'in neden olduğu meningokokkal hastalığı olan 1047 kişilik hasta grubunda ve 787 kan donöründen oluşan kontrol grubunda Asp299Gly polimorfizmini incelemişlerdir. Polimorfizm ile hastalığa yatkınlık ya da hastalığın ciddiyeti arasında bir ilişki bulamamışlardır.

N.meningitidis ile yapılan bir başka çalışmada Allen ve ark. (130) 252 menenjit vakasının %20.2'sini Asp299Gly heterozigot mutant, %3'ünü homozigot mutant olarak saptamışlardır. Kontrol grubunda da benzer şekilde Asp299Gly heterozigot polimorfizmini %20.3, homozigot polimorfizmini %1.2 oranlarında bulmuşlardır. Polimorfizm ve *N.meningitidis* menenjiti arasında bir ilişki saptamamışlardır. Bu durum Gambiya'lı çocuklarda polimorfizmin menenjite yatkınlıkta önemli bir rolü olmadığını belirtmişlerdir.

Schmitt ve ark. (131) 116 sağlıklı beyaz Alman katılımcıda Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini çalışmışlardır. Katılımcıların %0.8'inde Asp299Gly heterozigot polimorfizm, yine %0.8'inde Thr399Ile heterozigot

polimorfizmi, %9.4'ünde her iki heterozigot polimorfizm ve %0.8'inde her iki homozigot polimorfizm birlikte saptanmıştır.

Mutlubaş ve ark. (132) 19'u kronik allogreft nefropatili 69 böbrek alıcısı çocuk ve 115 sağlıklı kontrolde Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerini değerlendirmişlerdir. Böbrek alıcılarının %11.6'sında Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmini saptamışlardır. %4.3'ünde Asp299Gly, %7.2'sinde Thr399Ile heterozigot polimorfizmlerini tespit etmişlerdir. Bunların hiç biri eş ayrışım mutasyonu göstermemiştir. Hem Asp299Gly hem de Thr399Ile homozigot polimorfizmine rastlanmamıştır. Kronik allogreft nefropatili olan hastaların %10.5'inde Asp299Gly polimorfizmi saptanmışken, Thr399Ile polimorfizmi bu hastaların hiç birinde bulunmamıştır.

Ducloux ve ark. (133) böbrek nakil alıcılarında yaptıkları çalışmada alıcıların %10.9'unda Asp299Gly heterozigot polimorfizmi gözlemişlerdir. Bu polimorfizm alıcıların %9.2'sinde Thr399Ile ile birlikte, %1.6'sında izole olarak saptanmıştır. Thr399Ile polimorfizmini alıcıların %9.6'sında bulmuşlar ve %0.42'sinde izole olarak tespit etmişlerdir. Alıcıların %11.3'ünde Asp299Gly / Thr399Ile polimorfizmlerini saptamışlar

Palmer ve ark. (77) kadavradan nakil yapılan 122 alıcıda ve verici olan kadavrada TLR4 polimorfizmlerini değerlendirmişlerdir. Alıcıların %15'inde Asp299Gly ve/veya Thr399Ile polimorfizmlerini saptamışlar, %8.2'sinde bu iki mutasyon birlikte bulunurken %5.7'sinde izole Asp299Gly polimorfizmi, %0.8'sinde izole Thr399Ile polimorfizmi tespit edilmiştir. İzole Asp299Gly polimorfizmi alıcıların %98.4'ünde heterozigot, %1.6'sına homozigot mutant bulunurken izole Thr399Ile polimorfizminin hepsi heterozigot olarak bulunmuştur. Vericilerin ise %16'sında Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi tespit etmişlerdir. Vericilerde homozigot polimorfizme rastlanmamıştır. Vericilerin %14.7'sinde Thr399Ile polimorfizmi Asp299Gly polimorfizmi ile

beraber saptanırken, %1.6'sında izole bulunmuştur. İzole Asp299Gly polimorfizmi saptanmamıştır.

Böbrek nakil alıcı ve vericilerinde Nogueira ve ark. (76) TLR4 polimorfizmlerini incelemişlerdir. Alıcıların %8.5'inde Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi saptanmış. Asp299Gly ve Thr399Ile %4.5'inde birlikte bulunurken, %3.5'inde izole Asp299Gly, %0.5'inde izole Thr399Ile polimorfizmi gözlemiştir. Homozigot polimorfizm Asp299Gly ve Thr399Ile birlikte bulunduğu hastaların sadece 1'inde gözlenmiş, çalışma popülasyonunun %0.5'ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Vericilerin ise %10.2'sinde Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi olduğu belirtilmiştir. Asp299Gly ve Thr399Ile %4.3'ünde birlikte bulunurken, %5.4'ünde izole Asp299Gly, %0.5'inde izole Thr399Ile polimorfizmi gözlenmiştir. Homozigot polimorfizm Asp299Gly ve Thr399Ile birlikte bulunduğu hastaların sadece 1'inde gözlenmiş, çalışma popülasyonunun %0.5'ini oluşturduğu saptanmıştır.

Krüger ve ekibi (134) tarafından 267 böbrek alıcısında TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri incelenmiştir. Katılımcıların %11.2'sinde eş ayrışım mutasyonu saptanmıştır.

Asp299Gly ve/veya Thr399Ile polimorfizmleri Cervea ve ark. (135) tarafından 233 böbrek nakil alıcısından oluşan çalışma grubunda %9.5 oranında bulunmuştur.

Çalışmamızda örneklerin %2.4'ü Thr399Ile heterozigot mutant bulunurken, homozigot mutasyon bulunmadı. Asp299Gly polimorfizmi, incelenen örneklerin %6.6'sında (%4.4 heterozigot ve %2.2 homozigot mutant) saptandı. Thr399Ile ve Asp299Gly eş ayrışım mutasyonu %2.2

oranında saptandı. Mutasyonların hepsi alıcılarda tespit edildi, vericilerde bulunmadı. Alıcıların % 3.2'sinde Thr399Ile heterozigot polimorfizmi, %9.3'ünde Asp299Gly polimorfizmi (%6.2 heterozigot, %3.1 homozigot form) bulundu. Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmi alıcıların %9.2'sinde bulundu. Katılımcılar tek tek incelendiğinde biri dışında polimorfizm saptanmayan vericilerden böbrek alan alıcılarda da polimorfizm gözlenmediği tespit edildi. Sağlıklı gönüllüler, gram negatif enfeksiyonu olan hastalar, böbrek nakil alıcı ve vericilerinde yapılan çalışmalarda mutasyon oranları farklılık göstermektedir. Mutasyon sonuçlarımızda Ducloux, Palmer, Nogueira ve Krüger'in yürüttükleri çalışmalardan farklılıklar vardır (76,77,133,134). İlk üç araştırmacı izole formdan daha çok eş ayrışım mutasyonunu; Krüger (134) sadece eş ayrışım mutasyonunu saptamıştır. Bizim verilerimizde ise Asp299Gly izole formunun eş ayrışım mutasyonundan daha sık olduğu gözlemlendi. Thr399Ile ise sadece eş yarışım mutasyonu olarak bulundu. Thr399Ile homozigot mutasyona bizim çalışmamızla uyumlu olarak Palmer ve ekibi de (77) rastlamamıştır. Yine Palmer ve ark. (77) çalışmalarında Asp299Gly homozigot polimorfizmini %1.6 oranında bildirmiştir. Bizim sonucumuz da benzer şekilde %2.2 olarak tespit edildi. Sonuçlarımız Mutlubaş ve ark. (132) Asp299Gly sonuçlarına göre yüksek, Thr399Ile sonuçlarına göre düşüktür. Çalışmalarında eş ayrışım mutasyonuna ve homozigot polimorfizme rastlanmamışken, bizim çalışmamızda eş ayrışım mutasyonu %2.2 oranında bulundu, %2.2 oranında Asp299Gly homozigot polimorfizm tespit edildi. Hem Nogueira (76) hem de Palmer ve ekiplerinin (77) vericilerde de polimorfizm saptamalarına rağmen bizim sonuçlarımızda çalışmaya dahil ettiğimiz vericilerde polimorfizm olmadığı görülmektedir. Alıcılardaki Asp299Gly/Thr399Ile sonuçlarımız Mutlubaş, Nogueira, Cervea, Ducloux ve ark tarafından bulunan sonuçlar ile benzer, izole polimorfizm sonuçlarımız Nogueira'nın sonuçlarından yüksek, Palmer'in sonuçlarından ise düşük olarak bulundu. Bu sonuçların toplumsal farklılıkları yansıttığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı toplumlarda farklı oranlar bulunmuştur. Mutlubaş ve ark. nın sonuçları, çalışmanın Türk toplumunda yapılmış olması açısından önemlidir. Aynı toplumdaki sonuçların farklılık göstermesi, çalışmaların küçük populasyonlarda yapılmış olmasına

bağlanmaktadır, daha geniş kapsamlı çalışmalar gerekmektedir. Çalışmaların geneline bakılacak olursa, Dünya'da eş ayrışım mutasyonları daha sıklıkla gözlenirken, Mutlubaş ve bizim çalışmamızda olduğu gibi Türk'lerde izole formlar daha sık gözlenmiştir. Dikkat çeken diğer bir nokta tüm dünyada Thr399 ile homozigot polimorfizminin çok nadir gözlendiğidir. Nogueria ve ekibi sadece eş ayrışım mutasyonunda tespit edebilmiştir (76, 77,132,133).

Doğal immün sistem enfeksiyona karşı ilk engel olarak görev yapmaktadır (136). Kompleman sisteminin doğal immün savunmada önemli bir rolü vardır ve üç farklı yolak tarafından aktive edilmektedir (137). Memeli laktinleri mikroorganizmalarda eksprese edilen karbonhidratlara selektif bağlanan ve mikroorganizmaların fagositozunu ilerleten bir grup proteindir. MBL kollektin ailesi üyesi bir akut faz reaktanıdır. MBL spesifik MASPs kullanarak komplemanı aktive eder. Komplemanın aktivasyonu; MAK, opsoninler, anafilaktik ve kemotaktik ürünlerin oluşmasını başlatır (138).

MBL'nin klinik önemi; yaygın, tekrarlayan, ciddi enfeksiyonlara açıklanamayan yatkınlığı olan bir çocukta opsonin yetersizliğinin olası sebebi olarak tanımlanmasıyla ilk kez anlaşılmıştır (94).

MBL seviyeleri sağlıklı popülasyonda değişkendir. MBL seviyelerini MBL geninin ekson 1'deki üç tek nukleotid değişimi belirlemektedir. Bu mutasyonlar MBL seviyelerinde belirgin düşüklüklere neden olmaktadır (113).

Literatürde bazı çalışmalar MBL seviyelerini ölçmüş, bir kısmı MBL genotipini saptamış, kimi araştırmacı her iki yöntemi de kullanmıştır. Bu nedenden dolayı yapılan çalışmaların verilerini karşılaştırmak zordur. MBL eksikliğinin kesin sınırları yoktur. Başlangıçta eksiklik test saptama limitlerinin altı olarak bildirilmiştir. Testler daha duyarlı hale gelince genel

populasyondan 100 ng/ml daha düşük olan konsantrasyonlar MBL eksikliği olarak tanımlanmıştır. Beyaz ırkın yaklaşık olarak %10'u bu gruptadır. MBL eksikliği sık immün yetmezliklerden biridir (106). Birçok klinik çalışma MBL eksikliğini belirlemek için "cut-off" değeri kullanmıştır. Ancak bu konuda da tam bir görüş birliği yoktur; kimi araştırmacı "cut off" değerini 400 ng/ml alırken, 500 ng/ml'yi kullanan araştırmacılar da vardır (85, 93,103,110,116,117).

MBL eksikliğinin çocuklar ve erişkinlerde bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (95, 115,139,140). MBL eksikliği; organ nakil alıcıları gibi immün yetersiz kişilerde enfeksiyon hastalıklarının gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (93,141). Diğer yandan nakil öncesi yüksek MBL seviyeleri de kötü greft gidişi ve rejeksiyonla ilişkili olduğu belirtilmektedir (110).

Verschuren ve ark. (85) eş zamanlı pankreas ve böbrek nakli olan 152 hastada ELISA yöntemiyle MBL seviyelerini çalışmışlardır. MBL "cut-off"unu 400 ng/ml olarak belirledikleri çalışmada hastaların % 28.9'unu "cut-off"un altında, düşük MBL seviyesine sahip bulmuşlardır. Eş zamanlı pankreas ve böbrek nakli alıcılarında yapılan başka bir çalışmada Berger ve ark. (117) 99 alıcının nakil öncesi elde edilen örneklerini incelemişlerdir. "Cut-off" değerinin 500 ng/ml olarak belirlendiği çalışmada hastaların %34.3'ünün düşük MBL seviyeleri olduğunu göstermişlerdir. Berger ve ark. (110) başka bir çalışmalarında 235 böbrek nakil alıcısından nakil öncesi topladıkları örneklerin %36.5'ini 400 ng/ml'nin altında tespit etmişlerdir.

Ghods ve ekibi (93) 71 böbrek nakil alıcısında nakilden önce MBL seviyelerini ELISA ile değerlendirmiş, "cut-off"u 500 ng/ml olarak kabul etmişlerdir. Hastaların %21.1'inde MBL seviyelerini bu değerin altında saptamışlardır. Sagedal ve ark. da (103) nakil öncesi 159 böbrek nakil

alıcısında MBL seviyelerini ölçmüştür. Araştırmacılar hastaların %22.6'sında MBL konsantrasyonlarını 500 ng/ml'den küçük bulmuşlardır.

Daha küçük kapsamlı bir araştırmada Manuel ve ekibi (116) 16 böbrek nakil alıcısını kapsayan bir çalışma yapmışlardır. MBL değeri 500 ng/ml'den küçük olanları MBL eksikliği olarak kabul etmişlerdir. Katılımcıların %56'sında MBL eksikliği saptamışlardır.

Bu çalışmada "cut off" değeri olarak, önceki çalışmalarda MBL gen SNP'si ile uyumlu bulunan değer olan 400 ng/ml alındı (117). Çalışmaya dahil edilen örneklerin (alıcı ve vericiler) %34.4'ünün plazma MBL değeri 400 ng/ml'den küçük olarak tespit edildi. Alıcıların %33.8'i, vericilerin %36' sında MBL seviyeleri <400 ng/ml bulundu. MBL seviyeleri açısından alıcı ve vericiler arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Alıcılardaki sonuçlarımız Berger ve Verschuren'in sonuçları ile uyumlu bulundu (85,117). Ghods ve Sagedal'in alıcılarda buldukları sonuçlara göre bu çalışmadaki değerler daha yüksektir (93,103). Manuel ve ekibi ise bize göre daha yüksek bir oran bulmuşlardır. Manuel ve ekibinin sonuçları diğer çalışma sonuçlarına göre de oldukça yüksektir (116). Bunda araştırmacıların küçük bir popülasyonda çalışmış olmalarının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde böbrek naklinde TLR4 polimorfizmi ile cinsiyet arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Rezazadeh ve ark. (142) brusellozlu 198 hastada Asp299Gly polimorfizmini araştırmışlardır. Çalışmalarında Asp299Gly heterozigot polimorfizmini erkeklerde daha yüksek sıklıkta saptamışlar (erkeklerde %75.7, kadınlarda %50.5), sonuçları istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulmuşlardır. Bu çalışmada Thr399Ile polimorfizmi erkeklerde %4.5 oranında saptanırken kadınlarda gözlenmedi. Asp299Gly polimorfizmi ise erkeklerde %8.6; %4.3 heterozigot, %4.3 homozigot formda bulundu, kadınlarda %4.7 (heterozigot) oranlarında tespit

edildi. Cinsiyet ve TLR4 polimorfizmi arasındaki birliktelik istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, yüzde olarak erkeklerde daha çok gözlemlendi. Bu sonuçlar Rezazadeh ve ark. sonuçlarıyla uyumludur. Sonuçlarımız, böbrek naklinde erkek cinsiyetin TLR4 polimorfizmine yatkınlığını araştırarak çalışmalara veri olması açısından önemlidir.

Ip ve ark. (143) 689 Çinli kan donöründe yaptıkları çalışmada MBL seviyelerini cinsiyete göre değerlendirmişler ve kadın ile erkek cinsiyet arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Santos ve ekibi de (144) visceral leishmaniasis ve MBL seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri araştırmalarında; MBL seviyeleri ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Ghods ve ark. da (93) cinsiyet ve MBL seviyeleri arasında bir ilişki tespit etmemişlerdir.

Bu çalışmada; MBL seviyeleri erkeklerin %23.4'ünde kadınların ise %46.5'inde 400 ng/ml'den düşük saptandı. Kadınlarda MBL eksikliğinin daha sık olduğu gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Verilerimiz Ip, Santos, Ghods ve ekiplerinin (93, 143, 144) verileriyle zıtlık göstermektedir. Sonuçlarımız böbrek naklinde MBL eksikliği ve cinsiyet arasındaki birlikteliği inceleyecek ileri araştırmalar için veri olabilecektir.

Cinsiyetin TLR4 polimorfizmi ve MBL seviyeleri ile birlikteliği olup olmadığını değerlendirmek için daha kapsamlı ve çok sayıda çalışmaya gereksinim vardır.

Organ naklinden sonra mortalite ve morbidite bakımından en sık görülen enfeksiyon komplikasyonu CMV enfeksiyonudur (116). Nogueira ve

ark. (76) böbrek nakil alıcı ve vericilerinde yaptıkları TLR4 Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmlerini araştırdıkları çalışmalarında polimorfizm olan ve olmayan grup arasında CMV hastalığı açısından bir farklılık bulamamışlardır. Ducloux ve ekibi (133) CMV hastalığının TLR4 polimorfizmi olanlarda anlamlı olarak daha sık görüldüğünü saptamışlardır. Bir başka çalışmada Cervera ve ark. (135) TLR4 polimorfizmi olanlarda CMV hastalığının daha yüksek sıklıkta saptamışlardır. TLR4 mutasyonunun böbrek naklinden sonra CMV hastalığı gelişmesi için bağımsız bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmada PCR'ı pozitif olan 38 hastadan 14'ünün CMV antijenemi testi pozitif çıkarken; CMV antijenemi testi pozitif olan tüm katılımcıların PCR'ı da pozitif bulundu. Bu sebeple CMV enfeksiyonu ile TLR4 polimorfizmleri ve MBL seviyeleri karşılaştırılması yaparken her iki test ayrı ayrı değerlendirildi. Bu çalışmada da Nogueira ve ark. nın (76) sonuçlarına benzer şekilde TLR4 mutasyonları ve CMV enfeksiyonu arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadı. Tersine, TLR4 polimorfizmi olan hastaların hepsinde CMV antijenemi testi negatif bulundu. CMV PCR sonucu pozitif olan hastaların %2.9'unda ve negatif olan hastaların %3.6'sında Thr399Ile heterozigot polimorfizm bulundu. Asp299Gly polimorfizmi CMV PCR sonucu pozitif olan hastaların %5.4'ünde (heterozigot); negatif olan hastaların %14.2'sinde (%7.1 heterozigot, %7.1 homozigot form) saptandı. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar TLR4 polimorfizminin CMV enfeksiyonu için bir yatkınlık oluşturmadığını düşündürmektedir. İlginç olarak, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber TLR4 polimorfizmi olanlarda CMV enfeksiyonuna daha az rastlandığı saptandı. Bu sonuca benzer yayınlara ulaşılamamakla beraber, bir birliktelik olup olmadığının ortaya konması için geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

MBL, HIV'de bulunan gp120, hepatit B virusunda bulunan HBsAg gibi viral kaspit glikoproteinlerine bağlanabilmektedir. MBL'nin herpes simplex

virus 2 reaktivasyonu ile ilişkisi de ispatlanmıştır. CMV'nin zarfı kompleks bir yapıya sahiptir ve diğer herpes virusları ile benzer yapısal özellikler gösteren kapsit glikoproteinlerini paylaşır. Bu glikoproteinler MBL bağlanması için potansiyel hedefleri oluştururlar (135,145-147).

Cervera ve ekibi (135) CMV hastalığı ve TLR4 polimorfizmini değerlendirdikleri çalışmalarında MBL seviyeleriyle de ilişkisini incelemişlerdir. Düşük MBL seviyeleri olan grupta CMV hastalığı sıklığını daha yüksek bulmuşlardır. Başka bir çalışmada Ghods ve ark. da (93) benzer şekilde düşük MBL seviyeleri ile CMV hastalığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamışlardır. Küçük kapsamlı bir çalışmada Manuel ve ekibi (116) 16 böbrek nakil alıcısında MBL eksikliği ile CMV enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Tersine Verschuren ve ark. (85) CMV enfeksiyonu ve MBL eksikliği arasında anlamlı bir ilişki bulmamakla beraber; MBL eksikliği olanlarda CMV enfeksiyonuna daha sık rastlamışlardır. Sagedal ve ekibi de (103) MBL seviyesinin düşük olmasıyla CMV enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır. Çalışmamızda Verschuren ve Sagedal'ın sonuçlarına benzer şekilde CMV enfeksiyonu ve MBL eksikliği arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadı. CMV antijenemi sonuçları negatif olan hastaların %35.4'ünde, pozitif hastaların % 28.6'sında MBL eksikliği saptandı. CMV PCR testi negatif olan katılımcıların %32.1'inde, pozitif olanların %35.1'inde MBL eksikliği bulundu. CMV antijenemi pozitif olan hastalarda negatif olanlara göre MBL eksikliği daha düşük iken, CMV PCR testi pozitif olanlarda MBL eksikliği daha yüksek saptandı. Bu da MBL eksikliği ile CMV enfeksiyonu arasında bir birliktelik olabileceğini göstermektedir.

TLR4 polimorfizmi ve MBL eksikliğinin birçok viral hastalığa yatkınlığı arttırdığına dair çalışmalar vardır. BK polyomavirus son 20 yıl içinde keşfedilmiş greft kaybına yol açabilen, böbrek naklinde önemli bir virustur. BKVAN üreteryal hücrelerde BK virusun reaktivasyon ve replikasyonundan

dolayı ortaya çıkar ve böbrek nakil alıcılarının %1-10'unu etkilemektedir. JC virus olguların az bir kısmında da olsa polyomavirus nefropatisinden sorumludur (13).

Palmer ve ark. (77) TLR4 polimorfizmi olan vericiden doku alanlarda, doğal tip vericisi olanlara göre BK enfeksiyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha sık bulmuşlardır.

Bu çalışmada hem BK polyomavirus, hem de JC polyomavirus'un TLR4 polimorfizmi ve MBL eksikliği ile birlikteliği araştırıldı; sonuçlarda anlamlı bir farklılık bulunmadı. BK virus PCR sonucu pozitif olan hastaların hepsi Thr399Ile doğal tip, %3.7'si Asp299Gly homozigot; negatif olanların %5.6'sı Thr399Ile heterozigot, %10.3'ü Asp299Gly heterozigot, %2.6'sı homozigot mutant olarak tespit edildi. Polimorfizm, BK virus enfeksiyonu olmayanlarda daha sık görüldü. İncelenen literatürde MBL eksikliği ile polyomavirus enfeksiyonunun ilişkisini inceleyen yayınlara rastlanmadı. Araştırmamızda BK virus PCR'ı pozitif olanların %37.0'nda MBL eksikliği var iken; negatif olanların %33.3'ünde mevcuttu. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da BK virus PCR pozitif olanlarda MBL eksikliği daha sık bulundu. Çalışmamızda JC virus için de PCR sonuçları değerlendirildi; pozitif olanların %3.8'i ve negatif olanların %2.8'inde Thr399Ile heterozigot polimorfizm saptandı. Asp299Gly polimorfizmi de JC PCR sonuçları pozitif olan hastaların %14.3'ünde (%10,7 heterozigot form, %3.6 homozigot form); negatif olanların %5.2'sinde (%2.6 heterozigot form, %2.6 homozigot form) bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber JC virus PCR sonuçları pozitif olan katılımcılarda her iki polimorfizm de daha yüksek sıklıkta gözlemlendi. Bu sonuçlar da TLR4 polimorfizmleri, özellikle de Asp299Gly polimorfizmi ile JC virus enfeksiyonu arasında anlamlı bir birlikteliğinin daha geniş kapsamlı çalışmalarla göstertilebileceğini düşündürdü. JC polyomavirus PCR sonucu pozitif çıkan örneklerin %35,7'sinde, negatif çıkanların %34.2'sinde MBL

eksikliği saptandı; sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ve yüzdelerin birbirine yakın olduğu saptandı.

Organ nakillerinde uzun dönem greft sağkalımı amaçlanmaktadır. Yeni immünsupresif ajanların kullanımına rağmen greft başarısızlığı ve mortalitenin ana sebebi rejeksiyondur. Akut rejeksiyon genel olarak nakilden sonraki 6 ay içinde meydana gelmekte, uzun dönem akciğer, kalp ve böbrek sağkalımını tehlikeye atmaktadır (34).

Palmer ve ekibi (77) Asp/Thr polimorfizmi olan böbrek nakil alıcılarının %22'sinde; doğal tip taşıyan alıcıların %20'sinde akut rejeksiyon saptamış, istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır. Ducloux ve ark. (133) TLR4 polimorfizminin böbrek naklinde akut rejeksiyon riskini azalttığını belirtmiştir. Fekete ve ark. (75) benzer şekilde TLR4 polimorfizmlerinin uzun dönem renal allogreft sağkalımıyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Verschuren ve ekibi (85) akut rejeksiyon sıklığını MBL seviyesi düşük ve yüksek olan gruplarda aynı bulmuşlardır. Berger ve ark. (110) ise yüksek MBL seviyelerinin greft kaybı için bağımsız bir risk olduğunu belirtmiştir. Aynı ekip başka bir çalışmada böbrek nakil alıcılarında düşük MBL seviyelerini düşük akut rejeksiyon ve yüksek greft sağkalımı ile ilişkili bulmuştur (117).

Bu çalışmada alıcılardan hiç birinde akut rejeksiyon gözlenmedi. Bu nedenle de TLR4 polimorfizmi ve MBL seviyelerinin akut rejeksiyon ile birlikteliği değerlendirilemedi. Alıcılardan sadece birinde CMV enfeksiyonuna bağlı kronik rejeksiyon gelişti; TLR4 polimorfizmi ve MBL eksikliği saptanmadı.

TLR4 polimorfizmi ile gram negatif enfeksiyon arasındaki ilişki çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş; bir grup araştırmacı anlamlı bir ilişki bulmuş iken (70,125,126,128) farklı araştırmacılar da bulamamıştır (129,130).

Karoly ve ark. (69) çocuklarda yaptıkları çalışmalarında; Asp299Gly polimorfizminin üriner sistem enfeksiyonu riskini arttırdığını tespit etmişlerdir. Etken olarak en sık *E.coli* izole etmişlerdir.

Verschuren ve ark. (85) MBL eksikliği olanlarda üriner sistem enfeksiyonunu anlamlı olarak daha sık bulmuşlardır. Üriner sistem enfeksiyonunun en sık etkeni olarak *E.coli* izole edilmiştir. Benzer şekilde Ghods ve ekibi de (93) MBL seviyeleri düşük olan katılımcılarda daha sık üriner sistem enfeksiyonuna rastlamışlardır.

Katılımcıların idrar kültürlerinde üreme olup olmadığına dosyalarından ulaşıldı. İdrar kültürlerinde çeşitli mikroorganizmalar üreyen katılımcıların hepsinin Thr399 ile doğal tip olduğu, Thr399 ile polimorfizmi saptananlarda da idrar kültüründe üreme olmadığı gözlemlendi. Asp299Gly polimorfizmi idrar kültüründe üreme olanların %9.4'ünde (tamamı heterozigot), üreme olmayanların %3.8'inde (%1.9 heterozigot ve %1.9 homozigot form) saptandı. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak idrar yolu enfeksiyonu olanlarda Asp299Gly polimorfizmi daha fazla bulundu. İdrar yolu enfeksiyonu ve MBL eksikliği arasında anlamlı bir birliktelik saptanmadı; kültürde üremesi olan katılımcıların %34,4'ünde ve üremesi olmayanların %30.8'inde MBL eksikliği saptandı. Sonuçların birbirine yakın olmasına rağmen, idrar yolu enfeksiyonu olanlarda MBL eksikliğinin biraz daha sık olduğu gözlemlendi. Bu çalışmadaki sonuçlar Karoly ve ark. (69) sonuçlarına yakın bulundu. MBL sonuçlarımızın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Verschuren ve Ghods'un sonuçları ile benzer olduğu saptandı (85,93).

İdrar kültürü üremeleri etkenler açısından incelendi. Kültürde üremesi olan Asp299Gly heterozigot mutant örneklerin %100'ünde *Escherichia coli* üremesi bulundu. Bunlardan %33.3'ü saf *E.coli* iken, %66.6'sının çoklu etkenli enfeksiyon olduğu tespit edildi. Kültürde üremesi olan MBL değerleri 400 ng/ml'den küçük örneklerin %9.1'inde gram negatif dışı mikroorganizmalar saptanırken, %90.9'unda en az bir gram negatif etken saptandı. Bunların da %80'inde etkenlerden biri olarak *E.coli* bulundu. Bu çalışmada da Karoly ve Verschuren' in çalışmalarında olduğu gibi en sık üriner sistem enfeksiyonu yapan etkenin *E.coli* olduğu saptandı (69,85).

TLR4 polimorfizmleri ve MBL seviyelerinin katılımcıların çeşitli özellik ve test sonuçlarıyla karşılaştırılmasında; vericinin canlı ya da kadavra olması, alıcı veya verici olması, CMV, BK virus, JC virus enfeksiyonları arasında anlamlı bir birliktelik saptanamadı. TLR4 polimorfizmleri ve cinsiyet arasında da anlamlı bir birliktelik bulunamadı. MBL seviyeleri kadınlarda erkeklere oranla anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu birlikteliklerin netlik kazanması için geniş kapsamlı çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Alıcılardaki Asp299Gly/Thr399 ile sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalar ile benzer bulundu.

SONUÇLAR

- 1- Örneklerin 43'ü (%47.7) kadınlardan, 47'si (%52.2) erkeklerden toplandı.
- 2- Böbrek alıcılarının 19'una (%29,2) kadavradan, 46'sına (%70.3) canlı vericiden nakil yapıldığı tespit edildi.
- 3- Değerlendirmeye alınan örneklerin 2'si (%2.4) Thr399Ile heterozigot mutant bulundu, homozigot mutanta rastlanmadı.
- 4- İncelenen örneklerin 4'ü (%4.4) Asp299Gly heterozigot ve 2'si (%2.2) homozigot olmak üzere 6'sında (%6.6) Asp299Gly polimorfizmi saptandı.
- 5- İki örnekte (%2.2) Thr399Ile/Asp299Gly eş ayrışım mutasyonu saptandı.
- 6- Örneklerin 31'inin (%34.4) plazma MBL değeri 400 ng/ml'den küçük bulundu.
- 7- TLR4 polimorfizmlerinde kadın ve erkek cinsiyeti arasında anlamlı bir farklılık bulunmamakla ($p>0.05$) beraber erkeklerde daha çok (Erkek: Thr399Ile %4.5, Asp299Gly %8.6. Kadın: Thr399Ile 0, Asp299Gly %4.7) gözlemlendi.
- 8- MBL değerleri kadınlarda erkeklere oranla anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p< 0.05$) (%23.4'e %46.5).
- 9- TLR4 polimorfizmleri ve MBL seviyeleri için böbrek alıcı ve vericisi arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Bununla beraber

vericilerde hiç polimorfizm tespit edilmedi (Thr399Ile %3.2'ye %0.0, Asp299Gly %9.3'e %0.0).

10-CMV enfeksiyonu ve TLR4 mutasyonları arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadı ($p>0.05$). Tersine, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber TLR4 polimorfizmi olanlarda CMV enfeksiyonuna daha az rastlandığı saptandı.

11-CMV enfeksiyonu ve MBL eksikliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulunmadı ($p>0.05$).

12-BK polyomavirus, JC polyomavirus ile TLR4 polimorfizmi ve MBL eksikliği arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadı. Tersine, TLR4 polimorfizmi, BK virus enfeksiyonu olmayanlarda istatistiksel anlamlılık olmamasına rağmen daha sık görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber BK virus PCR pozitif olanlarda MBL eksikliği daha sık bulundu (%37.0'a %33.3) ($p>0.05$).

13-İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla beraber JC virus PCR sonuçları pozitif olan katılımcılarda her iki polimorfizm de daha yüksek sıklıkta gözlemlendi (Thr399Ile %3.8'e %2.8, Asp299Gly %14.3'e %5.2) ($p>0.05$).

14-İdrar kültüründe üreme ile TLR4 polimorfizmleri ve MBL seviyeleri arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p>0.05$). Thr399Ile polimorfizmi saptananlarda idrar kültüründe üreme olmadığı gözlemlendi. İdrar yolu enfeksiyonu olanlarda Asp299Gly polimorfizmi daha fazla bulundu, MBL eksikliği biraz daha sık gözlemlendi (Asp299Gly %9.4'e %3.8, MBL %34.4'e %30.8).

15-İdrar kültüründe üremesi olan Asp299Gly heterozigot mutant örneklerin %100'ünde *Escherichia coli* üremesi tespit edildi.

16-İdrar kültüründe üremesi olan MBL değerleri 400 ng/ml'den küçük örneklerin %90.9'unda en az bir gram negatif etken; bunların da %80'inde etkenlerden birinin *E.coli* olduğu saptandı.

ÖZET

TLR4 polimorfizmleri böbrek nakil alıcılarında azalmış akut rejeksiyon oranı ve artmış enfeksiyon riskiyle ilişkilendirilmiştir. Düşük MBL seviyeleri özellikle uzamış immünsupresyonda çeşitli enfeksiyon etkenlerine azalmış konak savunmasıyla ilişkili bulunmuştur.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Sağlık, Araştırma ve Uygulama Merkezi Organ Nakli Birimince takip edilen hastalardan toplam 90 örnek toplandı. TLR4 polimorfizmleri (Asp299Gly ve Thr399Ile) “real-time” PCR kullanılarak incelendi. MBL seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Demografik ve klinik veriler hasta kayıtlarından elde edildi. Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri sırasıyla %6.6 ve %2.4 olarak tespit edildi. Alıcılardaki Asp299Gly/Thr399Ile oranları %9.2 olarak bulundu. Örneklerin %34.4’ünde MBL seviyeleri 400 ng/ml’nin altında saptandı. TLR4 polimorfizmleri, MBL yetersizliği ile alıcı ya da verici, CMV, BK virus, JC virus enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı tek bulgu MBL yetersizliği ve cinsiyet arasında saptandı. MBL seviyeleri kadınlarda anlamlı olarak düşük bulundu. Bununla beraber cinsiyet ve TLR4 polimorfizmleri arasında anlamlı bir birliktelik saptanmadı. İstatistiksel olarak anlamlı birliktelik olmamakla beraber BK virus PCR pozitif olanlarda düşük MBL seviyeleri, JC virus PCR sonuçları pozitif olan katılımcılarda her iki polimorfizm ve idrar yolu enfeksiyonu olanlarda Asp299Gly polimorfizmi ile düşük MBL seviyeleri daha sık gözlemlendi. İlginç olarak, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber TLR4 polimorfizmi olanlarda CMV enfeksiyonuna ve BK virus enfeksiyonuna daha az rastlandı. Alıcıların hiç birinde akut rejeksiyon gözlenmedi bu sebeple TLR4 polimorfizmleri, MBL seviyeleri ile akut rejeksiyon arasındaki bir birliktelik olup olmadığı karşılaştırılmadı.

Sonuç olarak TLR4 polimorfizmleri, MBL seviyeleri ile çeşitli enfeksiyöz ajan arasında anlamlı bir birliktelik saptanmadı. Böbrek naklinde TLR4 polimorfizmleri, MBL seviyeleri ile enfeksiyon ve akut rejeksiyon birlikteliğini araştıran daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Böylece verici seçim kriterleri değerlendirilirken bu durum göz önünde bulundurulması enfeksiyon ve rejeksiyonun nlenmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: TLR4 polimorfizmleri, MBL seviyeleri, RT-PCR, Böbrek nakli.

SUMMARY

In kidney recipients, the TLR4 gene polymorphisms are associated with increased infection risk and reduced acute rejection rates. Low MBL levels are related to decreased host defense against various infectious agents, especially in prolonged immunosuppression.

In this study, a total of 90 specimens were collected from patients who were followed by Transplantation Unit of Health, Research and Training Center of Pamukkale University. Analysis of TLR4 polymorphisms (Asp299Gly and Thr399Ile) were performed using real-time PCR. MBL levels were measured by using ELISA. Demographic and clinical data was obtained from patient records. The Asp299Gly and Thr399Ile polymorphism rates were found as %6.6 and %2.4 respectively. Asp299Gly/Thr399Ile rates was found as 9.2% in recipients. MBL levels were found below 400 ng/ml in the %34.4 of specimens. There wasn't any significant association between TLR4 polymorphisms, MBL deficiency and recipients or donors, CMV, BK virus, JC virus infections, urinary tract infection. The only statistical significant finding was detected between MBL deficiency and gender. MBL levels were found significantly low in female. Although there was not any significant association between gender and TLR4 polymorphisms. Despite the fact that there were not any significant associations, low MBL levels in patients who had positive BK virus PCR, both polymorphisms in patients who had positive JC virus PCR, Asp299Gly and low MBL levels in patients who had urinary tract infection observed more often. Interestingly; despite the fact that there were not any significant associations, CMV and BK virus infections detected more less in patients who had TLR4 polymorphisms. None of recipients had acute rejection, because of this we could not compare whether there was an association between TLR4 polymorphism, MBL levels and acute rejection or not.

As a result; any significant association between TLR4 polymorphisms MBL levels and various infectious agents were not found. Large scale studies must be performed to understand the relation between TLR4 polymorphisms, MBL levels and infections and acute rejection in kidney transplantation. When this condition is considered, it may contribute to prevention on infections and acute rejection.

Key Words: TLR4 polymorphisms, MBL levels, RT-PCR, Kidney transplantation.

KAYNAKLAR

1. Davis CL, Delmonico FL. Living-Donor Kidney Transplantation: A review of the current practices for the donor. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 2098-2110.
2. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994;331: 365-376.
3. Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 2753-2758.
4. Morris PJ. A medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* 2004;351: 2678-2680.
5. Haberal M, Emiroğlu R, Dalgıç A, Karakaylı H, Moray G, Bilgin N. The impact of cyclosporine on the development of immunosuppressive therapy. *Transplant Proc* 2004;36: 143S-147S.
6. Wolfe R, Ashby V, Milford E, Ojo A, Ettenger R, Agodoa L et. al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341: 1725-1730.

7. Şahin G, Yalçın AU. Renal transplant hastasında geç gelişen Citomegalovirus (CMV) enfeksiyonu. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 2007;16: 198-200.
8. Türkmen A, Yıldız A, Ecdar T, Aydın EA, Erkoç R, Türk S. ve ark. Posttransplant sitomegalovirus hastalığı. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 1998;7: 35-39.
9. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of *Cytomegalovirus* infection and disease in transplant recipients. Clin Infect Dis 2002;34: 1094-1097.
10. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Degré M, Holter E, Foss A. et al. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. Transplantation 2000;70: 1166-1174.
11. Mitterhofer AP, Pietropaolo V, Barile M, Tinti F, Fioriti D, Mischitelli M. et al. Meaning of early polyomavirus-BK replication post kidney transplant. Transplant Proc 2010;42: 1142-1145.
12. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. Transplantation 2010;89: 1057-1070.

13. Kumar D. Emerging viruses in transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23: 374-378.
14. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 335-376.
15. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124: 783-801.
16. Netea MG, van der Graaf C, van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 2004;75: 749-755.
17. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13: 816-825.
18. Turvey SE, Hawn TR. Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* 2006;120: 1-9.
19. Badur S. Doğal Bağışıklık. Editörler: Camcıoğlu Y, Deniz G. *Temel İmmunoloji*. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007: 21-39.

20. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2001;1: 135-145.
21. Lin T, Zhou W, Sacks SH. The role of complement and Toll-like receptors in organ transplantation. *Transpl Int* 2007;20: 481-489.
22. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002;30: 1-11.
23. Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006;80: 220-226.
24. Goldstein DR. Toll-like receptors and acute allograft rejection. *Transpl Immunol* 2006;17: 11-15.
25. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci* 2000;68: 241-258.
26. Fleer A, Krediet TG. Innate immunity: Toll-like receptors and some more. A brief history, basic organization and relevance for the human newborn. *Neonatology* 2007;92: 145-157.
27. Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: The *Drosophila* Toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12: 393-416.

28. Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12654-12658.
29. Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* 2002;9: 2-10.
30. Beutler B. Signal transduction during innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans* 2001;29: 853-859.
31. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003;85: 85-95.
32. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 2004;34: 73-82.
33. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, Van der Ven AJ, Van der Meer JW. et al. Functional consequences of Toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 2008;14: 346-352.
34. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: The potential role of Toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005;5: 969-975.

35. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2: 675-680.
36. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002;14: 380-383.
37. Alegre ML, Goldstein DR, Chong AS. Toll-like receptor signaling in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13: 358-365.
38. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007;13: 460-469.
39. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA. et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303: 1522-1526.
40. Liu G, Wu Y, Gong S, Zhao Y. Toll-like receptors and graft rejection. *Transpl Immunol* 2006;16: 25-31.
41. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11: 373-384.

42. Kwon J, Park J, Lee D, Kim YS, Jeong HJ. Toll-like receptor expression in patients with renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2008;40: 3479-3480.
43. Van Rijn BB, Roest M, Franx A, Bruinse HW, Voorbij HA. Single step high-throughput determination of Toll-like receptor 4 polymorphisms. *J Immunol Method* 2004;289: 81-87.
44. Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91: 1-12.
45. Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 2004;201: 9-25.
46. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M. et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 11416-11421.
47. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303: 1526-1529.

48. Anders HJ, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 854-867.

49. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20: 197-216.

50. Van der Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer JW. et al. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005;30: 264-268.

51. Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Curr Opin Immunol* 2004;16: 538-544.

52. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002;3:3011.1-3011.6.

53. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14: 103-110.

54. Verstak B, Hertzog P, Mansell A. Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Inflamm Res* 2007;56: 1-10.

55. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2: 253-258.
56. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 499-511.
57. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7: 353-364.
58. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2: 835-841.
59. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K. Et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169: 6668-6672.
60. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301: 640-643.

61. Bin LH, Xu LG, Shu HB. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem* 2003;278: 24526-24532.
62. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T. et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4: 1144-1150.
63. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003;24: 286-290.
64. Mink M, Fogelgren B, Olszewski K, Maroy P, Csiszar K. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 2001;74: 234-244.
65. Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7: 1074-1081.
66. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and

premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002;52: 373-376.

67.Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347: 185-192.

68.Török HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004;112: 85-91.

69.Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ et al. Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res* 2007;61: 371-374.

70.Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186: 1522-1525.

71.Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5: 156-164.

72. Zhang DX, Hewitt GM. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 2003;12: 563-584.
73. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25: 187-191.
74. Nogueira E, Ponciano VC, Naka EL, Marques GD, Cenedeze MA, Câmara NO et al. Toll-like receptors-related genes in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy and acute rejection. *Int Immunopharmacol* 2009;9: 673-676.
75. Fekete A, Viklický O, Hubáček JA, Rusai K, Erdei G, Treszl A et al. Association between heat shock protein 70s and toll-like receptor polymorphisms with long-term renal allograft survival. *Transpl Int* 2006;19: 190-196.
76. Nogueira E, Ozaki KS, Macusso GD, Quarim RF, Camara NOS, Pacheco-Silva A. Incidence of donor and recipient Toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2007;39: 412-414.
77. Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the

development of rejection after renal transplantation. Clin Transplant 2006;20: 30-36.

78.Krüger B, Schröppel B, Murphy BT. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. Transplant Rev 2008;22: 131-140.

79.Von Aulock S, Schröder NW, Gueinzius K, Traub S, Hoffmann S, Graf K et al. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. J Infect Dis 2003;188: 938-943.

80.Heesen M, Wessiepe M, Kunz D, Vasickova K, Blomeke B. Rapid and reliable genotyping for the Toll-like receptor 4 A896G polymorphism using fluorescence-labeled hybridization probes in a real-time polymerase chain reaction assay. Clin Chim Acta 2003;333: 47-49.

81.Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. Editör: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 35-43.

82.Yağcı A. RFLP ve PCR bazlı tipleme yöntemleri. Editör: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 149-160.

83. Durmaz R. DNA baz dizi analizi. Editör: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 169-171.
84. Roos A, Daha MR, van Pelt J, Berger S.P. Mannose-binding lectin and the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22: 3370-3377.
85. Verschuren JJ, Roos A, Schaapherder AF, Mallat MJ, Daha MR, de Fijter JW et al. Infectious complications after simultaneous pancreas-kidney transplantation: a role for the lectin pathway of complement activation. *Transplantation* 2008;85: 75-80.
86. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002;8: 582-587.
87. Berger SP, Roos A, Daha MR. Complement and the kidney: what the nephrologist needs to know in 2006? *Nephrol Dial Transplant* 2005;20: 2613-2619.
88. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y. et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2000;105: 1363-1371.
89. Bos IG, Ten Berge IJ, Hack CE. Role of complement in graft rejection after organ transplantation. *Transfus Med Rev* 2002;16: 251-264.

90. Daha MR, van Kooten C, Roos A. Compliments from complement: A fourth pathway of complement activation? *Nephrol Dial Transplant* 2006;21: 3374-3376.
91. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods* 2001;257: 107-116.
92. Guardia A, Lozano F. Mannose binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. *Rev Med Microbiol* 2003,14: 41-52.
93. Ghods FJ, Solgi G, Amirzargar AA, Nikbin B, Ghods AJ. High frequency of clinically significant infections and Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients with serum mannose-binding lectin deficiency. *Iran J Kidney Dis* 2009;3: 28-33.
94. Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation and autoimmunity. *Hum Immunol* 2006;67: 247-256.
95. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37: 1496-1505.

96. Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2001;13: 74-78.
97. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17: 532-540.
98. Bak M, Tırak D. Nefrolojide mannoz bağlayıcı lektin. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2008;17: 44-52.
99. Higgins R, Mitchell D. Mannose-binding lectin; the sugary-sticky side of transplantation. *Transplantation* 2009;88: 149-150.
100. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002;56: 630-641.
101. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001;358: 614-618.
102. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaebler W, Laursen SB, Poulsen K. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997;386: 506-510.

103. Sagedal S, Thiel S, Hansen TK, Mollnes TE, Rollag H, Hartman A. Impact of the complement lectin pathway on cytomegalovirus disease early after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 4054-4060.
104. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40: 423-429.
105. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis* 2007;44: 1593-1601.
106. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol* 2007;44: 3875-3888.
107. Gorgi Y, Sfar I, Aouadi H, Makhoul M, Abderrahim E, Jendoubiayed S et al. Mannose binding lectin (+54) exon 1 gene polymorphism in Tunisian kidney transplant patients. *Transplant Proc* 2009;41: 660-662.
108. Lam MF, Leung JC, Tang CC, Lo WK, Tse KC, Yip TP et al. Mannose binding lectin level and polymorphism in patients on long-term peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20: 2489-2496.

109. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus Med* 2002;12: 335-352.
110. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Fujita T, de Fijter JW, Daha MR. Association between mannose-binding lectin levels and graft survival in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2005;5: 1361-1366.
111. Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001;180: 86-99.
112. Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol* 2001;38: 133-149.
113. Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannose-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998;161: 3169-3175.
114. Garred P, Pressler T, Lanng S, Madsen HO, Moser C, Laursen I et al. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2002;33: 201-207.

115. Kakkanaiyah VN, Shen GQ, Ojo-Amaize EA, Peter JB. Association of low concentrations of serum mannose-binding protein with recurrent infections in adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5: 319-321.
116. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and Cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007;83: 359-362.
117. Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Schaapherder AF, Doxiadis II, van Kooten C et al. Low pretransplantation mannose-binding lectin levels predict superior patient and graft survival after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2007;18: 2416-2422.
118. Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrard CS, Turner MW et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock* 2006;25: 88-93.
119. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572: 401-413.
120. Geleijns K, Jacobs BC, van Rijs W, Tio-Gillen AP, Iaman JD, Van Doorn PA. Functional polymorphisms in LPS receptors CD14 and TLR4 are not associated with disease susceptibility of *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barre' patients. *Journal of Neuroimmunology* 2004;150: 132-138.

121. Misch AE, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci* 2008;114: 347-360.
122. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 2005;41: 403-407.
123. Michel O, LeVan TD, Stern D, Dentener M, Thorn J, Gnat D, et al. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 923-929.
124. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003;197: 1787-1791.
125. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162: 1028–1032.
126. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocaña MG, Meana A et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006;143: 404–413.

127. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K et al. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 2003;109: 426-431.
128. Gao HK, Zhou ZG, Li Y, Chen YQ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis: a study in the Chinese population. *Pancreas* 2007;34: 295-298.
129. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS. et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001;184: 640-642.
130. Allen A, Obaro S, Bojang K, Awomoyi AA, Greenwood BM, Whittle H. et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22: 1018-1019.
131. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002;48: 1661-1667.

132. Mutlubas F, Mir S, Berdeli A, Ozkayin N, Sozeri B. Association between Toll-like receptors 4 and 2 gene polymorphisms with chronic allograft nephropathy in Turkish children. *Transplant Proc* 2009;41: 1589-1593.
133. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005;67: 2454-2461.
134. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106: 3390-3395.
135. Cervera C, Lozano F, Saval N, Gimferrer I, Ibañez A, Suárez B. et al. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation* 2007;83: 1493-1500.
136. Takahashi K, Ip WE, Michelow IC, Ezekowitz RA. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* 2006;18: 16-23.
137. Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjöholm AG, Würzner R et al. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 2005;296: 187–198.

138. Zimmermann-Nielsen E, Baatrup G, Thorlacius-Ussing O, Agnholt J, Svehag SE. Complement activation mediated by mannan-binding lectin in plasma from healthy individuals and from patients with SLE, Crohn's disease and colorectal cancer. Suppressed activation by SLE plasma. *Scand J Immunol* 2002;55: 105-110.
139. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997;314: 1229-1232.
140. Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K. et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001;285: 1316-1321.
141. Cervera C, Lozano F, Linares L, Antón A, Balderramo D, Suárez B et al. Influence of mannose-binding lectin gene polymorphisms on the invasiveness of cytomegalovirus disease after solid organ transplantation. *Transplant Proc* 2009;41: 2259-2261.
142. Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Kerammat F et al. TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis. *J Infect* 2006;53: 206-210.
143. Ip WK, To YF, Cheng SK, Lau YL. Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender

groups of southern Chinese adults. *Scand J Immunol* 2004;59: 310-314.

144. Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2001;69: 5212-5215.

145. Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;42: 1037-1045.

146. Ezekowitz RA, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1989;169: 185-196.

147. Gadjeva M, Paludan SR, Thiel S, Slavov V, Ruseva M, Eriksson K. et al. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin Exp Immunol* 2004;138: 304-311.