

T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**MATERNAL VE FETAL MBL2 GENOTİPLERİNİN PRETERM  
DOĞUMLARLA İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyolog Ayşe TANERİ

ANKARA, 2009

T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**MATERNAL VE FETAL MBL2 GENOTİPLERİNİN PRETERM  
DOĞUMLARLA İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.  
(Proje No: KA08/150)

Biyolog Ayşe TANERİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. F. Belgin ATAÇ

ANKARA, 2009

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması sırasında bana hem maddi hem de manevi yönden büyük destek olan anneme, babama ve Ozan Kater'e,

Her konuda desteğini gördüğüm değerli danışmanım Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. F. Belgin Ataç'a,

Başkent Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Namık Özbek, Doç. Dr. Aylin Tarcan ve Dr. Mutlu Karakaş'a,

Etlik SSK Kadın Doğum Hastanesi Başhekimisi Sayın Prof. Dr. Ali Haberal'a,

Eğitimimde değerli katkısı nedeniyle Sayın Prof. Dr. İ. Feride Şahin'e,

Çalışmalarım sırasında destek ve fikirlerini esirgemeyen Sayın Uzm. Bio. Hasibe Verdi ve Bio. Tendü Tekbaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 1. ÖZET

Yenidoğan döneminde, immün sistemin tam olarak gelişmemesine bağlı karşılaşılan komplikasyonlara ek olarak, yenidoğanın “prematüre” olması prenatal mortalite ve morbidite hızını arttıran başlıca faktördür. Görülme sıklığının %9 olması nedeni ile, günümüz perinatal tıbbının çözmeye çalıştığı ve çevresel, tıbbi ve kalıtsal faktörlerin rol oynadığı çoklu değişimlere bağlı bir yenidoğan sorunudur. Patogenezi aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda inflamasyonun gestasyonel süreci etkilemesi, preterm etkeni olarak kabul görmesine neden olmuştur. Bu bulgu inflamatuvar yanıtın oluşmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin, preterm yatkınlık faktörü olarak araştırılmasını gerektirmektedir. Mannoza bağlayan lektin-2 (MBL2) karaciğerden sentezlenir ve hipogammaglobulinemik fazda rol oynayan bir lektin yolağı proteindir. Maternal serum düzeyinin gebeliğin ilk trimesterinde artışına ek olarak nidasyon, plasantasyon ve hamileliğin devamında işlevsel olduğunun anlaşılması, MBL2'nin gebelik komplikasyonları-inflamasyon ilişkisinin aydınlatılmasında belirteç olabileceğini göstermiştir. Serum düzey farklılığı, 10q11.2-q21'e lokalize olan *MBL2* geninin promotör ve 1. ekzonundaki tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) kaynaklanmaktadır. Promotör bölgedeki polimorfizmler genin transkripsiyonunu etkileyerek protein düzeyindeki değişimlerden sorumludur. MBL geninin 1. ekzonunda meydana gelen gen varyantları ise proteinin homopolimer özelliğini bozarak, sitoplazmada degradasyona yatkın hale gelmesine neden olur. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda term ve preterm doğumlarla maternal-fetal MBL2 ekzon 1 genotiplerinin ilişkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla, 100 term (38,8±1,2 hafta) ve 83 pretermden (30,2±2,7 hafta) elde edilen maternal ve kord kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra MBL2 kodon 52 (db SNP ID rs5030737), 54 (db SNP ID rs1800450) ve 57 (db SNP ID rs1800451) genotiplerini PZR-RFLP analizi ile gerçekleştirilmiştir. Kodon 57 polimorfizminin toplumumuza özgü olmadığı gözlenirken, term doğumlarda maternal kodon 54 230 G/A genotipinin preterm doğum yapan annelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ( $p<0.045$ ) saptanmıştır. Preterm

grupta, fetal-maternal kodon 54 GG genotip sıklığının term fetal-maternal gruba göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.001).

Gebelik inflamasyonun arttığı bir süreçtir. Proinflamatuvar sitokin düzeyindeki artış gestasyonel süreci de kısaltır. Önceki çalışmalarda, kodon 54 230 G/A genotipinin düşük düzeyde MBL2 sentezlediğı gösterilmiştir. Bu veriler birleştirildiğinde, gestasyonel sürecin uzamasına neden olan genotipin bir avantaj sağladığı görülmektedir.

Multifaktöriyel hastalıklarda rol oynayan mekanizmaların tek bir parametre ile açıklanması söz konusu değildir. Gestasyonel sürecin devamlılığının sağlanması için fetal-maternal immünitenin karşılıklı regülasyonunda rol oynayan genler ile ilgili veri tabanlarının oluşturulması, ile risk gruplarının belirlenmesi mümkün olabilecektir. Bu nedenle, bu çalışmanın fetal-maternal immün regülasyonda rolü olan diğer faktörlerle birleştirilerek devam etmesi gerektiğı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mannoz bağlayan lektin-2 (MBL2), PZR-RFLP, preterm doğum, tek nükleotidlik polimorfizm (SNP)

## 2. SUMMARY

In addition to complications associated with the immature immune system of newborns, “preterm” birth is the main factor that increases prenatal mortality and morbidity. With a 9% incidence, it is a newborn problem associated with multi factorial variations, which environmental, medical and genetic factors enroll that has been tried to be solved. The molecular studies strongly indicate inflammation as a risk factor for shorter gestational age. These findings strongly suggest that gene polymorphisms in the inflammatory pathway are a candidate for the explanation to preterm tendency. A lectin pathway component mannose binding lectin-2 (MBL2) is synthesized in liver and participates in hypogammaglobulinemic phase. MBL2 is assigned as a marker for the explanation of pregnancy complications and inflammation not only due the increase in serum level in the first trimester of pregnancy but also it participates in nidation, placentation and maintenance of pregnancy. *MBL2* gene is located at 10q11.2-q21. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in promoter and/or in the first exon of the relative gene are responsible for the interindividual serum MBL level. Polymorphisms in promoter are responsible from changes in protein level by affecting transcription rate, where as variants in exon 1 are the cause of susceptibility to degradation in cytoplasm by degrading homopolymer structure of protein. Therefore, we felt it was prudent to evaluate further the relation between the maternal-fetal MBL2 exon 1 genotype and term- preterm births in our population.

Genomic DNA was isolated from maternal and cord blood samples of 100 term (38,8±1,2 weeks) and 83 preterm (30,2±2,7 weeks ) deliveries. MBL2 codon 52 (db SNP ID rs5030737), 54 (db SNP ID rs1800450) and 57 (db SNP ID rs1800451) genotyping was performed by PCR-RFLP. The frequency of codon 57 polymorphism was found to be zero for all groups. Maternal codon 54 230 G/A genotype frequency was significantly high in term births than the preterms ( $p<0.045$ ). In preterm group, the frequency of fetal-maternal GG genotype was also higher than term fetal-maternal group ( $p<0.001$ ).

Pregnancy is an inflammatory process. Therefore, the rise in proinflammatory cytokine level may shorten the gestational process. Previously it was reported that codon 54 230 G/A genotype synthesizes MBL2 in low level. As a result, the genotype associated with longer gestational period is an advantage for term pregnancy.

The pathological mechanisms of multi factorial disease can not be predicted by using a single marker. There it necessitates further investigation by using other genes enrolling in the delicate balance between fetal-maternal immune system. Therefore the collective data may provide insights of the pathological mechanism and hence may predict the individuals under risk.

**Keywords:** Mannose-binding lectin-2 (MBL2), PCR-RFLP, preterm delivery, single nucleotide polymorphism (SNP)

# İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	iii
2. SUMMARY	v
3. KISALTMALAR VE SİMGELER	ix
4. ŞEKİLLER	xi
5. TABLOLAR	xii
6. GİRİŞ	1
7. GENEL BİLGİLER	3
7.1. MannoZ Bağlayan Lektin (MBL)	5
7.2. Kompleman Sistemi	6
7.3. MannoZ Bağlayan Lektin-İlişkili Serin Proteazlar ( <i>“MBL-associated serine proteases”</i> -MASPs)	9
7.4. Fikolinler	13
7.5. MBL'nin Yapı ve Görevleri	14
7.6. MBL Genindeki Polimorfizmler	19
7.7. MBL'nin Hastalıklarla İlişkisi	21
7.8. MBL'nin Preterm Doğum ile İlişkisi	23
8. GEREÇ VE YÖNTEM	25
8.1. Gereçler	25
8.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	25
8.1.2. Tampon ve çözeltiler	25
8.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	27
8.2. Yöntemler	28
8.2.1. Genomik DNA izolasyonu	29



8.2.2. MBL genotiplemesi	30
8.2.3. İstatistiksel analiz	36
9. BULGULAR	37
10. TARTIŞMA	44
11. SONUÇ	49
12. KAYNAKLAR	50

### 3. KISALTMA VE SİMGELER

<b>aa</b>	Amino asit
<b>Bç</b>	Baz Çifti
<b>CCP</b>	Komplement kontrol proteini
<b>CRD</b>	Karbohidrat tanıma bölgesi
<b>CD</b>	“Cohn’s disease”
<b>COLEC-2</b>	“Collectin subfamily member-2”
<b>CF</b>	“Cystic Fibrosis”
<b>C4bC2a</b>	C3 konvertaz
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	K3-etilendiamintetraasetik asit
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EtBr</b>	Etidyum Bromür
<b>EtOH</b>	Etil Alkol
<b>g</b>	Gram
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>Ig</b>	İmmünoglobulin
<b>I-MBL</b>	İntraselüler MBL
<b>kb</b>	Kilo baz
<b>kDa</b>	Kilo dalton
<b>L</b>	Litre
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit yapı
<b>M</b>	Molarite
<b>MASP</b>	Mannoz bağlayan lektin ile ilişkili serin proteaz
<b>MBL</b>	Mannoz bağlayan lektin
<b>mg</b>	Miligram

<b>ml</b>	Mililitre
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>OR</b>	Odds oranı
<b>PAMP</b>	Patojen ile ilişkili moleküler yapı
<b>PAGE</b>	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RA</b>	“Rhematoid Arthritis”
<b>RFLP</b>	“Restriction fragment length polymorphism”
<b>SDS</b>	Sodyumdodesil sülfat
<b>SLE</b>	“Systemic Lupus Erythematosus”
<b>S-MBL</b>	Serum MBL
<b>SNP</b>	“Single nucleotid polymorphism”
<b>SP</b>	Serin proteaz
<b>SP-A</b>	Süfaktan protein –A
<b>SP-D</b>	Süfaktan protein –D
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamin
<b>TLR</b>	Toll-benzeri reseptör
<b>u</b>	Ünite
<b>UC</b>	“Ulcerative colitis”
<b>Z-Gli-Arj-S-Bz1</b>	N-karboksibenziloksglisin -L- arjinin tiyo benzil ester
<b>µl</b>	Mikrolitre

## 4. ŞEKİLLER

<b>Şekil 7.1.</b> İnsan kolektinlerinden MBL, SP-A ve SP-D'nin yapısı.....	<b>5</b>
<b>Şekil 7.2.</b> Komplement aktivasyonunda lektin ve klasik yollar.....	<b>7</b>
<b>Şekil 7.3.</b> C1r/C1s/MASP enzim ailesi üyelerinin organizasyonu ve yapısı.....	<b>10</b>
<b>Şekil 7.4.</b> Fikolin'in bölge ve oligomerik yapısı.....	<b>13</b>
<b>Şekil 7.5/a.</b> MBL peptidinin yapısı.....	<b>14</b>
<b>Şekil 7.5/b.</b> İnsan MBL2 geninin yapısı ve kodlanan protein ürünleri.....	<b>15</b>
<b>Şekil 7.6.</b> MBL2 geninde yer alan promotör ve <i>cis-acting</i> elementler.....	<b>16</b>
<b>Şekil 7.7.</b> MBL2 geninde yer alan tek nükleotid polimorfizmleri.....	<b>20</b>
<b>Şekil 8.1.</b> MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 52 polimorfizminin 119 bç'lik DNA parçasının <i>HhaI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü.....	<b>33</b>
<b>Şekil 8.2.</b> MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 54 polimorfizminin 315 bç'lik DNA parçasının <i>BanI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü.....	<b>34</b>
<b>Şekil 8.3.</b> MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 57 polimorfizminin 315 bç'lik DNA parçasının <i>MbolI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü.....	<b>35</b>

## 5. TABLOLAR

<b>Tablo 7.1.</b> MBL2 ile ilişkilendirilen hastalıklar.....	<b>21</b>
<b>Tablo 8.1.</b> MBL2 geni kodon 52, 54 ve 57 PZR için kullanılan primer dizileri.....	<b>30</b>
<b>Tablo 8.2.</b> PZR protokolü.....	<b>32</b>
<b>Tablo 8.3.</b> RFLP analizinde kullanılan enzimler ve kesim paternleri.....	<b>37</b>
<b>Tablo 9.1.</b> Preterm ve term grubunun anne yaşı, gravida, para, gebelik haftası, doğum ağırlıkları ve cinsiyeti.....	<b>38</b>
<b>Tablo 9.2.</b> Örneklem alınan gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı.....	<b>39</b>
<b>Tablo 9.3.</b> Term ve preterm bebeklerin yoğun bakım izlemindeki sorunlarının gruplara göre dağılımı.....	<b>40</b>
<b>Tablo 9.4.</b> Fetal-maternal MBL2 genotiplerinin dağılımı.....	<b>41</b>
<b>Tablo 9.5.</b> Maternal kodon 54 için binary logistik regresyon analizi sonuçları.....	<b>41</b>
<b>Tablo 9.6.</b> Fetal-maternal kodon 52 polimorfizminin term grupta dağılımı.....	<b>41</b>
<b>Tablo 9.7.</b> Fetal-maternal kodon 52 polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	<b>41</b>
<b>Tablo 9.8.</b> Fetal-maternal kodon 54 polimorfizminin term grupta dağılımı.....	<b>42</b>
<b>Tablo 9.9.</b> Fetal-maternal kodon 54 polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	<b>42</b>

<b>Tablo 9.10.</b> Fetal-maternal kodon 57 polimorfizminin term grupta dağılımı.....	<b>43</b>
<b>Tablo 9.11.</b> Fetal-maternal kodon 57 polimorfizminin preterm grupta dağılımı.....	<b>43</b>

## 6. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem doğal ve adaptif olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Doğal bağışıklık, patojenlere karşı hızlı ve özgül olmayan yanıt şeklidir. Doğal bağışıklığın hem implantasyona ve hem de plasentaya invaze olmaya çalışan mikroorganizmalara karşı savunmada bulunması zorunlu bir yanıt olarak kabul edilmektedir (4).

*In vivo* çalışmalarda, gestasyonel dokulara bakteri, lipopolisakkarit veya bakteriyel endotoksin uygulamalarının proinflatuar sitokin ve prostoglandin sentezini artmasına bağlı olarak, preterm doğumu tetiklediği gösterilmiştir. Bu bulgu, doğal bağışıklık sisteminin preterm doğumun patogenezindeki rolünü işaret etmektedir. Proinflatuar bir protein olan Mannoza Bağlayıcı Lektin'inin, (MBL) preterm doğum ile ilişkisinin araştırılması da bu açıdan önem taşımaktadır (4,37).

Memelilerde embriyonun anne rahmine implantasyonuna izin veren evrimsel adaptasyon immunolojik bir problem oluşturur. Bağışıklık sisteminin kendi komponentlerini diğerlerinden ayırarak yabancı dokuları reddetme mekanizmasından farklı olarak, "fetal allograftı" reddetmemesi halen bütünüyle açıklanamamış bir paradokstur. Plasenta, fötusun anneye yamalanmasındaki fetal dokudur ve bağışıklığı uyarıcı bir etki oluşturarak, bazı antikorlar için seçici geçirgen bir zar görevi görürken, enfeksiyon gibi zararlı etkilere karşı koruyucu bir engel oluşturur. Fötusun devamlılığını sağlayabilmek için hem fetal immünitinin tanınması, hem de maternal immünitinin baskılanması gereklidir. Söz konusu bu baskılanmada, hem fetal ve hem de maternal faktörlerin rolü oldukça önemlidir. Bu baskılanma sürecinde oluşan değişikliğe bağlı olarak, gestasyonel süreç etkilenerek preterm doğumu tetiklemektedir (1,4).

MBL karaciğerde üretilen, bağışıklığın başlamasında önemli rol oynayan bir serum akut faz proteindir. Sürfaktan protein A (SP-A) ve D (SP-D) gibi

kolektin ailesinin bir üyesidir. Diğer kolektin aile üyelerinde olduğu gibi, MBL'nin karakteristik özelliği karbohidrat tanıma bölgesi (CRD) ve kollajen bölge içermesidir (7,10,34). MBL moleküler ağırlıkları yaklaşık 32 kDa (228 amino asit) olan birbirlerine benzer 3 polipeptitten oluşan trimerik yapıda olan bir proteindir. Buket benzeri yapı 3 - 6 trimerin bir araya gelmesi ile oluşur (12). Her polipeptid CRD, boyun bölgesi, kollajen bölge ve sisteinden zengin bölge içerir. Bu multimerik yapısı sayesinde Gram (+) ve Gram (-) bakterilere, mikobakterilere, virüslere ve mantarlara bağlanabilir (17,24). Böylece mikroorganizmaları çöktürerek, fagosite edilmelerini mümkün kılar. Ayrıca MBL, serin proteazların (MASP) aracılığı ile kompleman-lektin yolağını da aktive eder (29). Söz konusu aktivasyon işlemi, MBL'nin konakçı-savunma sisteminde önemli bir yer tutmasını sağlar. Bu olay özellikle immunitenin henüz gelişmediği, yeni kazanılacağı infantil süreçte önemlidir. MBL düzeyi düşük olan bireyler hayatın ilk döneminde ciddi bakteriyel enfeksiyonlara daha sık yakalanırlar (3).

*MBL2* geni diğer kolektin genleri gibi 10. kromozom üzerine lokalizedir ve 4 ekzondan oluşmaktadır. Ekzon 1'deki 54. kodondaki glisin'nin aspartik asit'e dönüşmesi, 57. kodondaki glisin'nin glutamik asit'e dönüşmesi ve 52. kodondaki arjinin'in sistein'e dönüşmesi, MBL proteininde fonksiyonel bozukluğa sebep olan başlıca varyasyonlardır. Söz konusu bu varyasyonlar serum MBL düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. Bozulan opsonizasyon ise organizmayı enfeksiyonlara açık hale getirmektedir (10,19).

Bu çalışmada amacımız, maternal – fetal MBL2 ekzon 1 genotiplerinin term ve preterm doğumlarla ilişkisinin araştırılmasıdır.



## 7. GENEL BİLGİLER

Bağıışıklık sistemi, doğuştan gelen ve sonradan kazanılmış (adaptif) korunma mekanizmalarından oluşur. Enfeksiyonlara karşı geliştirilmiş ilk savunma mekanizması, doğuştan gelen bağıışıklıktır (14,45). Omurgasızlarda doğuştan gelen bağıışıklık sistemi, enfeksiyona karşı asıl savunma mekanizması olup, fagositoz aracılığı ile oluşturulan ve özgül olmayan bir cevap şeklidir. Seğiciliğindeki gelişmişlik sayesinde kendi moleküllerini patojeninkilerden ayırt edebilir. İlk başlarda doğuştan gelen bu bağıışıklığın fagositlerle yapılan ve özgül olmayan bir immün yanıt olduğu düşünülse de, daha sonraları patojenler ile kendi bileşenlerini birbirinden ayırabildiği anlaşılmıştır (14,15). Bu moleküller, evrimsel süreçte korunmuş ve patojen ile uyarılan moleküler yolları tanınması nedeni ile omurgasızlara ek olarak omurgalıları da enfeksiyonlara karşı oldukça etkili bir şekilde korur. Konağın patojenlere karşı savunmasından başarıyla kağan patojenler çok sayıda “patern” tanıma molekülüne maruz kalır (45). Bu proteinler fagositozu kolaylaştırarak mikroorganizmaların yok edilmesini sağlar (26). Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptor –TLR), kolektinler ve fikolinler patern tanıma molekül ailesinin üyesidir. Üzerinde ęalıřılan insan kolektinlerinden biri mannoz bağlayan lektin 2 (MBL2) veya diğer bir adıyla “*collectin subfamily member 2 – COLEC2*”dir (19).

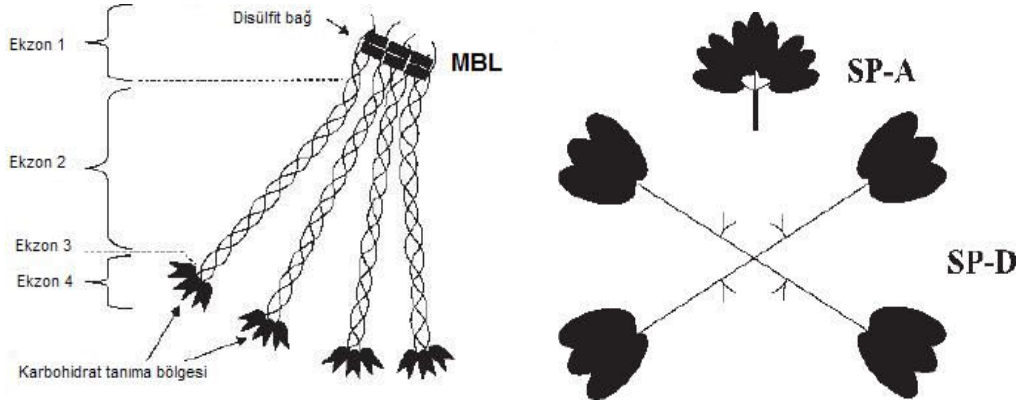
Sir Frank Macfarlane Burnet ve John McCrea tarafından yaklaşık 60 yıl önce İnfluenza virüsünü inaktive edici  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  inhibitörlerinden,  $\beta$  inhibitörüne MBL adı verilmiştir. Memeli serum lektininin varlığı ilk önce *Robinson ve ark. (1975)* tarafından bildirilmiş ve *Kawasaki ve ark. (1978)* MBL’yi tavşan karaciğerinden izole etmiştir. *Wild ve ark.* ise sığana ek olarak karaciğerden de izole etmişlerdir (12).

1968’de yeni doğmuş bir hastada plazma faktörü eksikliğine bağlı, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyon rapor edilmiştir (27). Hastada başka bir bağıışıklık yetersizliği gözlenmemesine rağmen, hasta serumunda bulunan

nötrofillerin *Saccharomyces cerevisiae*'yı (maya) fagosit edemediği görülmüştür (20). Bu bozukluk, aynı çalışmada başka bir verici serumu kullanılarak giderilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, bu söz konusu plazma faktörünün MBL olduğu anlaşılmıştır. *S. cerevisiae* kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalar, bağışıklıktaki bu eksikliğin patojen opsonizasyonlarından biri olduğunu göstermiştir. 1987'de, bağışıklık yetersizliği mekanizması açıklanarak, MBL'nin yapısal ve fonksiyonel olarak klasik komplement yolağının başlatıcı molekülü olan C1q'ya benzediği, ancak patojenlere antikordan bağımsız olarak bağlanabildiği gösterilmiştir (45).

## 7.1. MannoZ Bağlayan Lektin (MBL)

MBL proteini, karaciğer tarafından üretilen akut faz proteinidir. Hem kollajen bölgeleri hem de lektin bölgelerini oluşturan kolektin ailesinin üyesidir. Kollajenik ve lektin bölgelerinden dolayı kolektinler “mucociliary escalator”, fagositler ve diğer çözünebilir proteinler (laktoferrin, defensinler) ile birlikte solunum yolundaki ilk korumayı oluştururlar (11). İnsanlarda kolektinler, hidrofilik sürfaktan protein olan SP-A, SP-D ve MBL’yi kapsar (11,12,41). Majör insan kolektinlerinden olan SP-A ve SP-D’nin yapısal özellikleri MBL’ye benzer (41). Bunlar, çoğunlukla akciğer ve diğer mukozal bölgelerde bulunur. Üç polipeptid zincirinin bir araya gelmesi sonucunda klasik kollajen üçlü sarmal yapı ile söz konusu protein oluşur. C-terminal bölge ve bu üç zincirli alt ünite, daha sonra disülfid bağlarla stabilize edilerek yüksek yapılı oligomerleri oluşturur. MBL ve SP-A’nın buket benzeri bir yapısı varken, SP-D haç şeklindedir (11). (şekil 7.1)



şekil 7.1. İnsan kolektinlerinden MBL, SP-A ve SP-D’nin yapısı - *Davies ve ark. (11)*’den alınmıştır.

## 7.2. Kompleman Sistemi

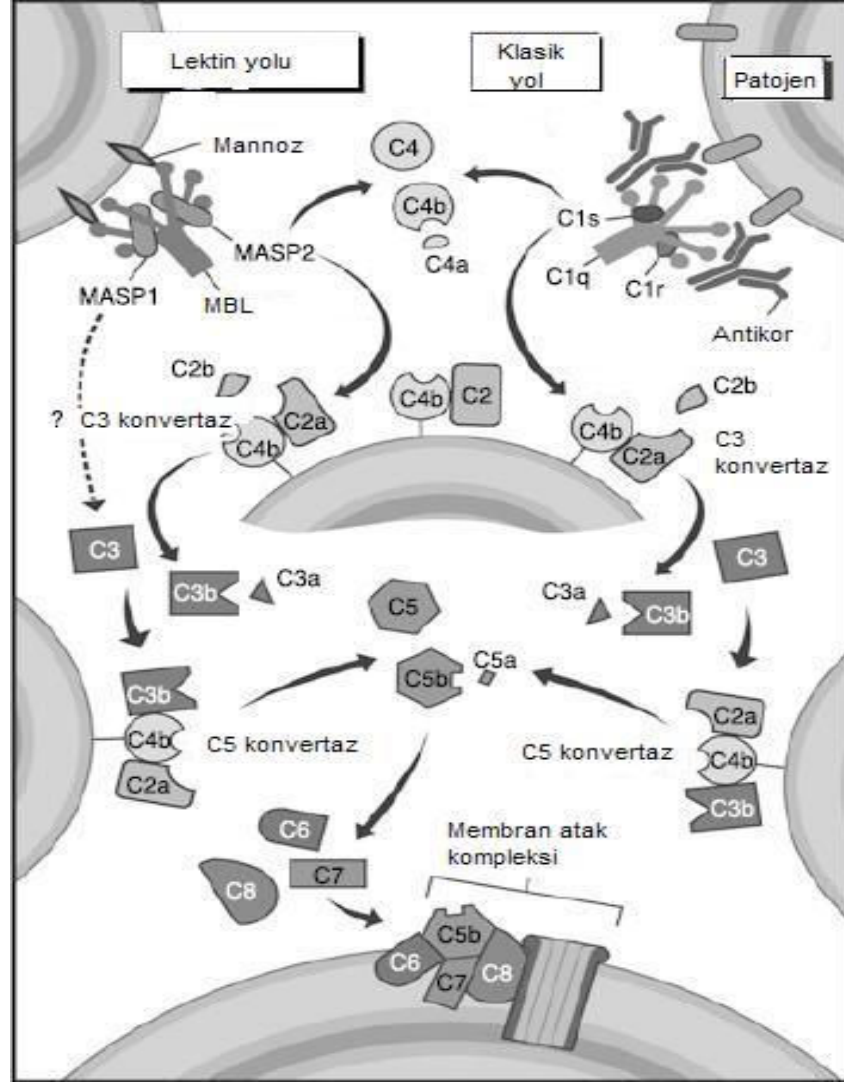
Dolaşımda ve zarda bulunan bir dizi proteoliz reaksiyonunun ve proteinlerin bir araya gelmesi, kompleman sistemi ile yürütülür (36). Yenidoğan bağışıklığının bir parçası olarak, patojenlere karşı ilk korumayı sağlar ve adaptif immün yanıtın gelişimi ve modülasyonunda da önemli rol oynar. Kompleman sistemi 35'ten fazla çözülebilir plazma proteini ve hücre yüzey bağlanma komponentlerinden oluşmaktadır. Bu proteinlerin çoğu karaciğerde, az miktarı ise mononükleer fagositlerde üretilir (18).

Komplemanda birbirini izleyen enzimsel olayların aktivasyonu alternatif yol, klasik yol veya lektin yolu ile yapılır. Bunun sonucunda ise mikrobiyal opsonizasyon, fagositlerin iyileştirilmesi ve bakteriyolizis gerçekleşir. Bu üç yolağın her biri C3'ü, C3b'ye kesecek olan konvertazın birikmesini sağlayarak mikrobiyal yüzeye etki eder. Klasik yolağın birçok üyesinin alternatif veya lektin yolaklarında yapısal ve fonksiyonel homologu vardır (40).

Klasik ve lektin yolakları birçok yönden birbirlerine benzer (Şekil 7.2). Her ikisinin de aktivasyonu sonucunda, C4bC2a (C3 konvertaz) enzim kompleksi meydana gelir. Tanıyıcı olan molekül, uygun aktivasyon yapısına bağlandığında bu yolaklar aktif hale gelir. Tanıyıcı moleküllerle etkileşen serin proteaz (SP) zimojenleri aktif hale gelerek, kaskadın bir sonraki komponentlerini de aktif hale getirir (18).

Klasik yolak, mikrobiyal yüzey antijenlerine bağlanan İmmünoglobulin G (IgG) veya Ig M ile aktive edilir. Bu bağlanma, antikorun Fc kısmında klasik yolaktaki tanıyıcı molekül olan C1q'nun bağlanabileceği bir bölge oluşturur (40). Bu molekül, 18 polipeptid zincirinden (6A,6B,6C) oluşur. Ayrıca 6 adet globular baş kısım ile 6 adet kollajen benzeri yapıya sahiptir. Globular başlar immün komplekslerinin antikor komponentlerine bağlanırken, kollajen uçlar C1r ve C1s SP tetramerlerini tutar. C1s-C1r-C1r-C1s tetramerinde her iki proteaz da ayrı

fonksiyonlara sahiptir. C1r otoaktivasyon sonucunda C1s zimojenini aktive eder. Aktif hale gelen C1s, C4 ve C2'yi kesmekten sorumlu olan C1 kompleksinin enzimatik komponentidir (16,35). Bunun sonucunda C3 konvertazı oluşur ve C3 konvertaz da C3'ü keserek (C3b) hedefin fagositik hücrelerce opsonizasyonunu veya hedef zarın geçirgen hale getirilmesini sağlar (36).



Şekil 7.2. Komplement aktivasyonunda lektin ve klasik yollar – *Worthley ve ark.* (45)'den alınmıştır.

C1r ve C1s'in ortak fizyolojik inhibitörü C1 inhibitörü'dür. Serpin tipinde bir inhibitör olan C1 inhibitörü, proteazların yalancı substratıdır. Aktif haldeki C1r ve C1s ile kovalent kompleksler oluşturur (18).

C3'ün, sadece ona özgü mikroorganizmalarla kovalent bağ oluşturabilen moleküller arası tiyo ester bağı vardır. Bu bağlanma komplement sisteminin en önemli özelliklerinden biridir. Bu yolla mikroorganizmalar, fagositler üzerindeki C3 reseptörleri ile tanınarak fagosite edilir ve geç komplement komponentleri olan C5-C9 sitolitik kompleksini (zara saldıran kompleks) oluşturmak üzere aktive olur (14).

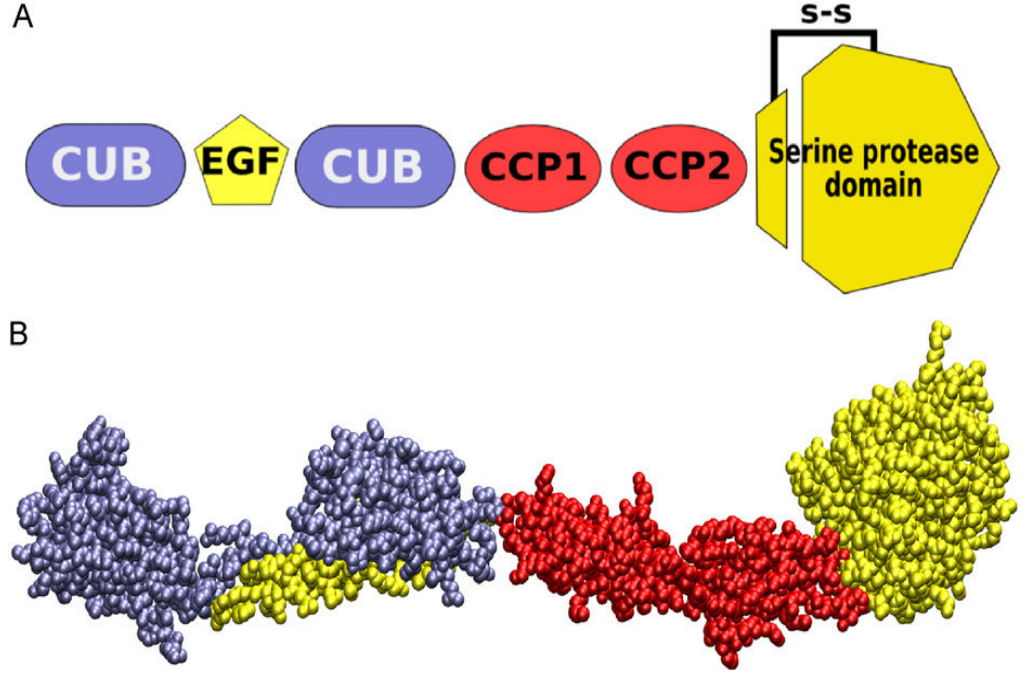
Lektin yolağında ise MBL ve fikolinler (H,L,M) gibi farklı tanıma molekülleri rol oynar. Bu moleküller, tek tip polipeptid zincirinden oluşmalarıyla ve mikroorganizmalar üzerindeki patojen ile ilişkili moleküler yapılara (PAMP) bağlanmaları dışındaki özellikleri ile C1q'ya benzerler. Lektin yolu, klasik yola benzerlik gösterir, ancak bu yolakta antikorlar görev almaz. Ayrıca, MBL ve fikolinlerin farklı patojenler için farklı oligomerik formları vardır (18). Mikrobiyal yüzeylerdeki mannoz içeren karbohidratlara bağlanırlar. Klasik yolaktaki C1r ve C1s ile yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösteren MASP'lar, MBL ile bir araya gelerek C4'ü aktive edecek bir kompleks oluştururlar (40).

### 7.3. MannoZ Bağlayan Lektin-İlişkili Serin Proteazlar (“*MBL-associated serine proteases*” - MASPs)

Lektin yolağındaki tanıyıcı komponentler olan MBL ve serum fikolinleri, patojenik hücrelerdeki şeker veya N-asetil gruplara doğrudan bağlanarak komplementi aktive edici 3 enzimi aktif hale getirir. Bu enzimlere “*MBL-associated serine protease*”- MASP denir. Yüksek yapılı MBL oligomerleri serin proteazlar ile birlikte fonksiyonel bir kompleks halinde bulunur. En baskın proteazlar MASP-1 (6µg/ml) ve MASP-2 (0.5µg/ml) iken, MASP-3 minör komponentlerdendir. Bunlara ek olarak proteolitik aktivitesi olmayan bir molekül olan MAp19 da (sMAP) lektin-MASP kompleksi ile bağlantılıdır (34).

MASP'lar, klasik yolaktaki C1r ve C1s'in homologudur. Hepsi aynı modüler organizasyona sahiptir. Bunlar; a) C1r/C1s komplement komponenti bulunan iki bölge: Uegf ve “*bone morphogenic protein 1*” – CUB bölgeleri, Ca<sup>+2</sup> bağlayan epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge ile bunları takiben 2 komplement kontrol proteini (CCP). b) C-terminal serin proteaz bölgeleri (Şekil 7.3). Amino terminal bölgesinin homodimerizasyonunda ve MBL'ye bağlanmasında CUB1:EGF:CUB2 kompleksi etkindir (18,44).

EGF benzeri bölgeye bağlanan Ca<sup>+2</sup> iyonu, hem intra hem de intermonomer CUB-1-EGF bağlantılarını stabilize eder. C1s ve MAp19'un CUB-1 modülünün distal sonunda ikinci bir Ca<sup>+2</sup>'a bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. Bu veriler, C1s ve MASP-2'nin Ca<sup>+2</sup>'a bağlı homodimerizasyonunu açıklamaktadır. Aynı yapısal prensiplerin MASP-1 ve MASP-3 proteazlarının homodimerizasyonunda da etkili olabileceği düşünölmektedir (18).



Şekil 7.3. C1r/C1s/MASP enzim ailesi üyelerinin organizasyonu ve yapısı - *Gál ve ark. (18)*'den alınmıştır.

Memeli MASP-2 (686 amino asit) ve MASP-19'un (185 amino asit) her ikisi de 1. kromozom üzerinde bulunan MASP-2/MASP-19 geninden "alternatif splicing" sonucu sentezlenir. MASP-19 proteini, MASP-2'nin CUB1 ve EGF modülünü ve ayrıca fazladan özel bir C-terminal (EQSL) tetrapeptidini içerir. MASP-1 (699 amino asit) ve serin proteaz bölgesi içermeyen MASP-3 de (728 amino asit) benzer olarak 3. kromozom üzerindeki MASP-1/3 geninden "alternatif splicing" ile oluşur. Bunlar, benzer amino terminal bölgelerine sahiptir, ancak farklı bağlanma ve serin proteaz bölgeleri vardır (18,44). Bu iki mozaik proteazın varlığı "ekzon shuffling"e iyi birer örnektir. Son çalışmalar, MASP-19'un MASP ile yarışıp, MBL ve fikoline bağlandığını göstererek, lektin komplemant yolağında düzenleyici bir görevi olduğunu düşündürmektedir (14).



MASP'lar genellikle zimojen halde bulunurlar. Lektin-MASP kompleksinin patojen üzerindeki hedef epitoplara bağlanması yapısal değişikliğe neden olur. Bunun sonucunda, MASP-1 ve MASP-2'nin CCP-2 modülü ve serin proteaz bölgeleri arasındaki arjinin-izolösin bağı kesilerek otoliz ile aktif hale gelir. (18,36,44).

Yalnızca MASP-2'nin komplement aktivasyonundaki rolü tanımlanmıştır. Klasik yolaktaki C1s gibi, MASP-2 ilk olarak C4'ü keserek C4b ve C4b2a'yı oluşturur. Oponinde kilit nokta olan C3b'nin yeterli düzeye gelmesiyle C5 konvertaz aktivite kazanır. C5 daha sonra anfilatoksin C5a'yı üretir ve C5b fragmanı, patojenlerin doğrudan parçalanmasına neden olan membran atak kompleksinin oluşumunu başlatır (Bkz. Şekil 7.2). MASP-1 ve MASP-3'ün görevleri daha az bilinmektedir, ancak MASP-1'in C3'e bağımsız olarak bağlanabildiği ve C2'yi kestiği görülmüştür. Böylece, lektin-MASP kompleksi ile tetiklenen komplement aktivasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (44).

MASP'ların substrat özgüllükleri ve fizyolojik rolleri tam olarak açıklanamamıştır. MASP-3'ün enzimatik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. *In vitro* deneyler MASP-3 zimojeninin kendi kendini aktive edemediğini göstermiştir. Ancak zimojeni kesen başka bir proteaz da tanımlanamamıştır. Aktif haldeki MASP-3'ün sentetik bir substrat olan *N*-karboksi benziloksglisin-L-arjinin tiyo benzil ester'i (Z-Gli-Arj-S-Bzl) ( $k_{kat}/k_m=1.94 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) kesebildiği gösterilmiştir (18). Bugünkü bilgilerimiz dahilinde MASP-3 için belirlenebilen tek substrat, "insülin benzeri büyüme faktörüne bağlanan protein 5"tir (IGFBP-5). Ancak bunun da fizyolojik bir substrat olduğu kesinlik kazanmamıştır (44). C1r/C1s/MASP ailesinde C1 inhibitörü ile inhibe edilemeyen tek proteaz MASP-3'tür. Bu proteazın C4 ve C2'yi kesen MASP-2'nin regülasyonunu azalttığı düşünülmektedir (18,44,45).

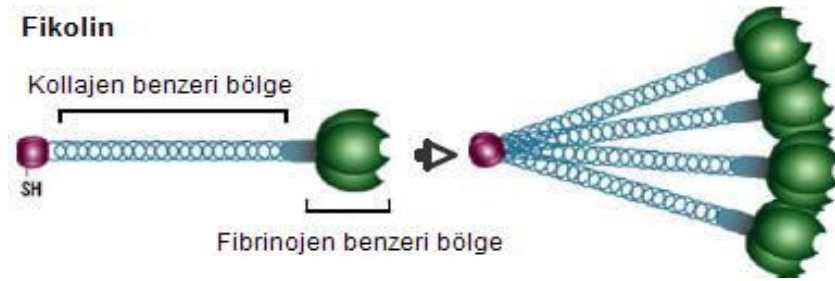
MBL ile MASP'lar arasındaki bağlanma, MBL'nin kollajen bölgesinin bir parçası ile MASP'ın amino-terminal bölgesi arasında gerçekleşir. MBL ile

MASP-1 arasındaki afinite 3.2nM, MBL ile MASP-2 arasındaki afinite 2.6 nM'dir. MASP'ın amino-terminal bölgelerinin üçü de (CUB1-EGF-CUB2) tam boydaki proteinlerin bağlanma özelliklerinin ortaya çıkması için gerekli ve yeterlidir (44).

Farklı MBL oligomerleri, komplementi farklı afinitelerle aktive eder. Sıçanda purifiye edilmiş trimer ( $1.18\pm 0.23$ ) ve tetramer ( $0.95\pm 0.05$ ) alt birimlerinin aktiviteleri en yüksek iken, bunu MBL dimerleri takip eder ( $0.24\pm 0.06$ ). Tekli alt birimlerin ise belirlenebilen bir aktivitesi yoktur. MBL dimer, trimer ve tetramerlerinin hepsinin fonksiyonel olup da tekli alt birimlerinin olmaması, kompleksin stoikometrisine bağlıdır. MASP dimerlerinin en az 2 MBL alt birimine bağlanma bölgesi vardır. En uygun yerleşim, MASP dimerinin her bir protomerinin bir MBL alt birimi için yüksek afiniteli bağlanma bölgesi içerdiği yapıdır. Bu nedenle, MBL dimerleri tek bir MASP dimerine sıkıca bağlanırken, trimer ve tetramerler iki MASP dimerine bağlanabilir. Dimer, trimer ve tetramerler en az bir MASP dimerine yüksek eğilim ile bağlanabilir. Tekli MBL alt birimleri de MASP'lara bağlansa da, afinitesi, büyük MBL oligomerlerinden ~1000 kat daha düşüktür ve bu da biyolojik aktivitelerinin düşük olmasına neden olur (44).

#### 7.4. Fikolinler

Fikolinler hem kollajen hem de fibrinojen benzeri bölgeleri içeren bir grup proteindir. MBL yolağı MASP'larla olduğu kadar fikolinlerle de aktive edilir. Fikolinler yapısal olarak kolektinlere benzer (Şekil 7.4). L,H (Hakata antijeni) ve M fikolin olmak üzere üçe ayrılır. Bunlar MASP ve MASP19'larla etkileşerek lektin yolağını aktive ederler. MBL ile kıyaslandıklarında farklı bağlanma özellikleri vardır (14).



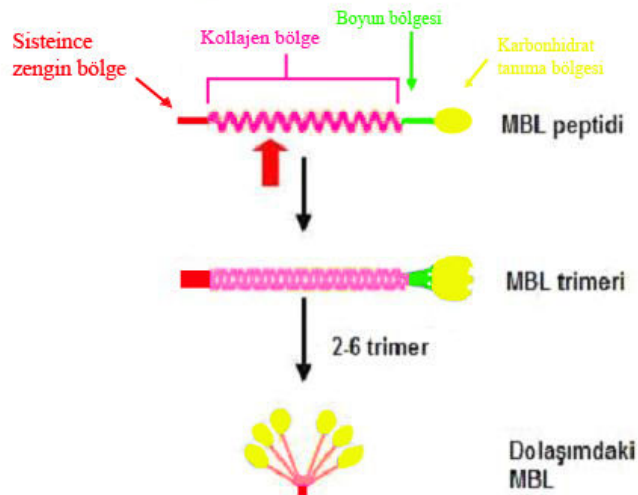
Şekil 7.4. Fikolin'in bölge ve oligomerik yapısı – *Endo ve ark.* (14)'den alınmıştır.

L- ve H- fikolinleri hepatositlerden sentezlenen salgısal faktörlerdir. L-fikolininin gram (+) bakteride bulunan lipoteikoik asite bağlandığı gösterilmiştir (14). Yapısında bulundurduğu kollajen ve fibrinojen benzeri bölgeler ile N-asetilglukozamin ve diğer bileşiklere bağlanabilir. MBL'ye kıyasla L-fikolin'nin daha seçici bir tanıma alanı vardır (36). H-fikolin bronşlarda, alveolar sıvıda ve safrada da bulunur. Ayrıca serum lektini olmayan ve lökositlerden sentezlenen bir M-fikolini belirlenmiştir. MASP ile etkileşen M-fikolin, lektin yolağını aktive eder ve seçici olarak *Staphylococcus aureus*'a bağlanır (12).

## 7.5. MBL'nin Yapı ve Görevleri

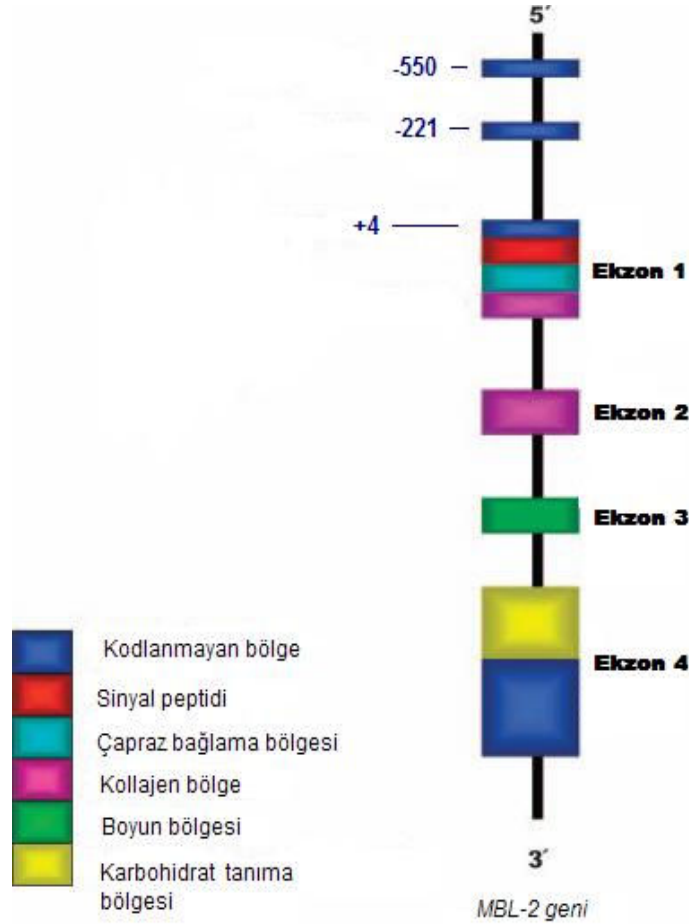
C-tipi bir lektin ( $Ca^{+2}$ 'a bağlı) olan MBL'nin bağışıklık sistemindeki rolü oldukça önemlidir. Birçok bulaşıcı hastalığa yatkınlık MBL eksikliğinden kaynaklanmaktadır. MBL iki formda bulunur: Serum-MBL (S-MBL) ve intraselüler-MBL (I-MBL). Her iki form da karaciğerde sentezlenir ve tek mRNA formunda translasyona uğrar. I-MBL'nin endoplazmik retikulum-golgi aygıtı arasındaki taşıyıcı veziküllerde ifadelendiği *Nonaka ve ark. (2007)* tarafından bildirilmiştir. S-MBL ise komplementi lektin yolağı üzerinden aktive eder (29).

Her iki MBL proteini de 32 kDa'luk (228 amino asit) üç özdeş polipeptid zincirinin bir araya gelmesiyle oluşan oligomerlerdir (Şekil 5). Bunlar kendi aralarında kollajene benzeyen üçlü sarmalları oluştururlar. Günümüzde bilinen iki tane MBL geni vardır; *MBL1* ve *MBL2*. Bu iki gen, gen dublikasyonu sonucunda ortak bir atadan köken almıştır (19). Bunlardan *MBL1* "pseudogen"dir. *MBL2* geninin ürünü ise translasyona uğrar (12). Fonksiyonel *MBL2* geni 10. kromozom üzerine (10q11.2-q21) lokalizedir ve 4 ekzondan oluşmaktadır. Her peptid, *MBL2* geninin farklı ekzonlarından kodlanan 4 ayrı bölgeyi kapsar (26). (Şekil 7.5/a)



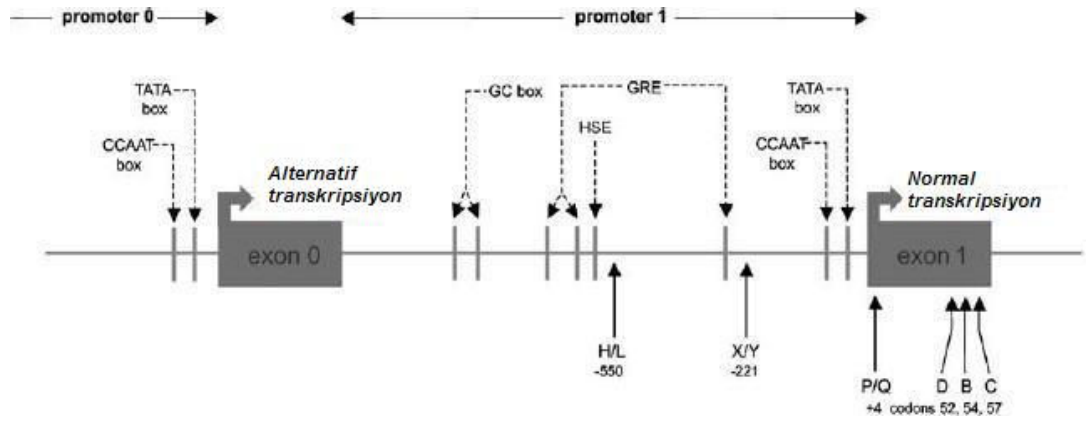
Şekil 7.5/a. MBL peptidinin yapısı - *Tsutsumi ve ark. (41)*'den alınmıştır.

Ekzon 1 (21 amino asit) sinyal peptidini, sisteinden zengin bölgeyi ve yedi kopya glisinden zengin kollajen bölgeyi kodlar. Ekzon 2 (59 amino asit) kollajen bölgenin geri kalanını (on iki kopya), ekzon 3 (30 amino asit) boyun bölgesi olarak bilinen  $\alpha$ -helikal sarmal yapıyı ve ekzon 4 (188 amino asit) ise kalsiyum-bağlı karbohidrat tanıma bölgesini (CRD) kodlar. Her zincirde; patojenleri oligosakkarit bölgelerinden tanıyan C-terminal bölge, kısa  $\alpha$ -helikal hidrofobik boyun bölge, 19 Gli-Xaa-Yaa tripletini (X ve Y herhangi bir amino asit) içeren kollajen bölge ve sisteinden zengin amino-terminal bölge vardır. Üçlü sarmal yapı, sisteinden zengin amino-terminal bölgesi içerisindeki hidrofobik ve disülfid bağlarla sabitlenir. Dolaşım sistemindeki tüm MBL'lerin temel yapısı bu şekildedir (12,21). (Şekil 7.5/a ve 7.5/b)



Şekil 7.5/b. İnsan *MBL2* geninin yapısı ve kodlanan protein ürünleri - *Dommett ve ark. (12)*'den alınmıştır.

*MBL2* geninin promotör bölgesindeki korunmuş elementler bu proteinin akut faz reaktantı olduğunun bir belirtisidir. Ekzon-1'in yaklaşık 1 kb'lık upstream bölgesinde ekzon-0 adı verilen fazladan bir alternatif ekzon bulunur. *MBL2* geninin transkripsiyonu bu bölgeden de başlatılabilir. Ekzon-0, proteine döndürülmez, bu nedenle oluşan alternatif transkript, predominant transkripte benzerdir. Karaciğerden üretilen MBL proteinin büyük çoğunluğu ekzon-1'den başlayan transkriptlerden meydana gelir, ancak yaklaşık %10-15'i ekzon-0'dan başlayan transkriptlerdir (19,21). (Şekil 7.6)



Şekil 7.6. *MBL2* geninde yer alan promotör ve *cis-acting* elementler - Garred ve ark. (21)'den alınmıştır.

MBL kollajen benzeri bölge aracılığı ile MASP'lar ile birleşir. Polipeptid zincirinin trimerizasyonu kollajenik üçlü helikal bölge ile sağlanır ve böylece bir alt birim oluşur. Sisteinden zengin amino-terminal bölge, üç polipeptid zinciri arasındaki kovalent modifikasyonu sağlar ve ayrıca birçok alt birimin oligomerik yapıya bağlanmasında görevlidir. Kısaca üç polipeptid, yapısal bir alt birim oluşturmak üzere bir araya gelir ve bunlardan 3-6 tanesi matür proteini oluşturur (14). (Bkz. Şekil 7.5/a)

Fonksiyonel MBL, yapısal birimin (homotrimerik) yüksek organizasyonlu multimerleri şeklinde (tetramerler, pentamerler ve heksamerler) oluşur. İnsan

MBL oligomerleri, dimerler ile heksamerler arasında değişiklik gösterirken, bunlardan trimer ve tetramerler baskın tiptir (44). X ışını kristalografi ile elektron mikroskobu çalışmaları, bu oligomerlerin buket-benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (12). Bu yapı, MBL lektin bölgesi ile patojen üzerindeki oligosakkarit arasında yüksek afiniteli bir ilişki oluşturur. Bunun sonucunda MBL multimerlerinin konformasyonu değişerek MASP aktivasyonu sağlanır (45).

MBL'deki heterojenite, oligomerlerin karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumdaki biyosentezinden kaynaklanır. "Pulse-chase" deneyleri göstermiştir ki, MBL alt birimleri tek başlarına hızla bir araya gelirken, protein daha büyük oligomerik formlara daha yavaş matürleşir. Oligomerlerin boyunu kontrol eden anahtar faktörler amino terminalindeki disülfid bağlarıdır. İnsan MBL'sinin her bir polipeptidinin bu bölgesi içerisinde, 3 sistein motifi bulunmaktadır. Sekresyondan önce eşlenmemiş sistein amino asitleri disülfid bağlar ile şapkalanmaya eğilimlidir. Bu oldukça önemli bir mekanizmadır, çünkü serbest sistein amino asitleri MBL için retansiyon sinyali gibi davranır. Bu nedenle yalnızca sisteinleri ortaya çıkmamış olan oligomerler sekresyon için hazırdır (45).

Bütün MBL proteinlerinin kollajen bölgelerinin ara noktasında, sisteinden zengin bölge ile kollajen bölge arasında ve kollajen bölge ile  $\alpha$ -helikal boyun bölgesi arasında boşluklar vardır. Bu bölgeler esnek bir menteşe gibi işlev görürler. MBL'deki bu esnek bölgeler kompleks aktivasyonunu indükleyici konformasyonel değişikliğe izin verir. Kollajen bölge ile boyun bölgesi arasındaki esneklik molekülün bakteriyel hücre yüzeyine yerleşimini sağlarken, molekülün diğer ucundaki değişiklikler de alt birimlerin yeniden dizilmelerine ve MASP aktivasyonuna neden olur (45).

MBL, CRD aracılığı ile  $Ca^{+2}$  varlığında piranoz zincirinden 3- ve 4-hidroksil gruplu karbohidratlara, korunmuş amino asitler olan Glu185, Asn187, Glu193, Asn205 ve Asp206 üzerinden bağlanır. MBL'nin en önemli ligantları arasında D-mannoz, N-asetilglukozamin ve glikoz vardır. Ancak, sterik ihtiyaca

uymayan D-galaktoz ve sialik asitin de MBL'ye karşı belirlenemeyen eğilimi vardır. MBL'nin sterik seçiciliği, patojenik mikroorganizmaların sahip olduğu karbohidrat rezidüllerinin tanınmasını ve kendi komponentlerini bunlardan ayırmasını sağlar (14).

MBL proteini mikroorganizmaların yüzeyindeki özgül şeker gruplarını tanıyarak yabancı olanları diğerlerinden ayırır. Yabancı yüzeydeki D-mannoz, L-fukoz ve N-asetilglukozamin gibi karbohidratları tanıyabilir (26,27). Ayrıca fosfolipitlere, nükleik asitlere ve glikozillenmiş proteinlere de bağlanabilir (12). CRD'nin monosakkaritlere karşı afinitesi zayıftır. Bu nedenle birden fazla MBL alt birimi içeren çoklu CRD-şeker bağlantıları MBL'nin patojenlere sıkı bağlanmasında ve komplement aktivasyonunda gereklidir (44). Mikroorganizmalara ait kapsül gibi özellikler MBL'nin bağlanmasını engeller ya da bağlanmasına izin verir. MBL bu multimerik yapısı sayesinde Gram (+) ve Gram (-) bakterilere, mikobakterilere, virüslere ve mantarlara bağlanabilir. Bu bağlanma ile mikroorganizmaların çöktürülerek fagosite edilmesi mümkün olmaktadır (27).

Mikroorganizmaların sahip oldukları farklı yapısal özelliklerin MBL bağlanmasına etkisini anlayabilmek için patojenik *Neisseria* kullanılarak bir dizi çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda kapsül ve terminal sialik asitin rolü araştırılmıştır. Sialik asite sahip organizmaların MBL'ye karşı dirençli oldukları görülürken, olmayanların MBL tarafından kolayca parçalandıkları saptanmıştır. Kapsülün varlığı veya yokluğunun lipopolisakkarit yapının (LPS) sializasyonundan daha az belirleyici olduğu görülmüştür. Ayrıca *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutantları ile yapılan çalışmada, O antijeninin etkilenmesinin MBL'ye bağlanmayı engellediği görülmüştür. LPS'nin üç boyutlu yapısının organizmaya MBL'nin bağlanmasında belirleyici bir rolü olduğu ve bazı LPS yapılarının ifadenmesinin MBL bağlanmasını azaltıcı bakteriyel virülent mekanizması gibi davrandığı görülmüştür (42).

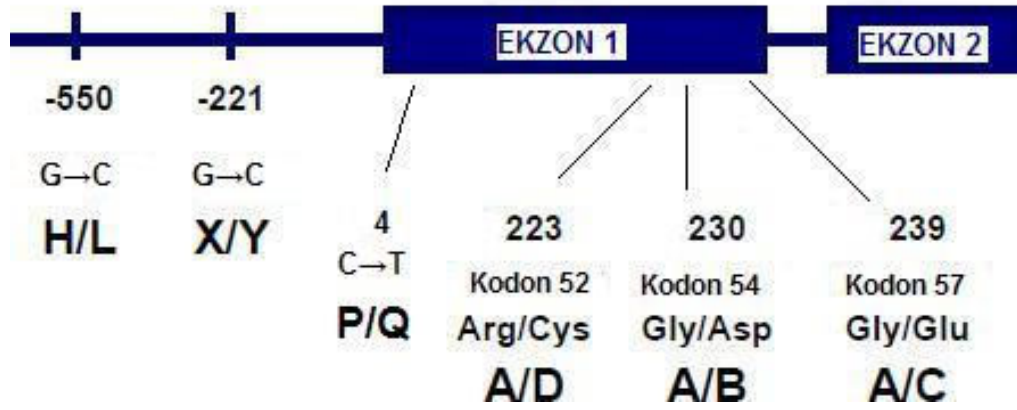


## 7.6. MBL Genindeki Polimorfizmler

İnsan sağlığındaki lektin yolağının önemi MBL genindeki polimorfizmler ve MASP-2 ile ilişkili immün eksiklikler ile belirlenmiştir. Belli bir popülasyon içerisindeki serum MBL konsantrasyonunun değişiklik göstermesi çoğunlukla kalıtsal faktörlere bağlıdır (45). MBL geninin gerek promotör ve gerekse de okuma bölgesindeki polimorfizmler, birçok bakteriyel, viral ve parazitik enfeksiyonlara yatkınlık sağlamaktadır. Özellikle çocukluk döneminde ve adaptif bağışıklık sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda (HIV, kemoterapi) bu risk artar. Komplementin koruyucu etkisinin yanı sıra, bazı durumlarda zamansız aktivasyonu konakta hasara neden olmaktadır (geçici iskemi sonrasında kalp ve böbrekte meydana gelen sitotoksisite gibi) (44).

Ekzon 1'deki üç farklı tek nükleotid polimorfizmleri ("single nucleotide polymorphism" – SNPs) MBL proteininde fonksiyonel bozukluğa sebep olmaktadır. Bunlar 54. kodondaki (db SNP ID rs1800450) glisinin aspartik asite dönüşmesi, 57. kodondaki (db SNP ID rs1800451) glisinin glutamik asite dönüşmesi ve 52. kodondaki (db SNP ID rs5030737) arjininin sisteine dönüşmesidir. Bu SNP'ler MBL peptidinin kollajen benzeri helikal yapısını bozar ve MBL peptidlerinin/peptid trimerlerinin multimerleri oluşturmasına engel olur. Polimorfizmlere göre adlandırma Şekil 7.7'de verilmektedir (Bu adlandırma bulunuş sıralarına göre yapılmıştır) (41).

Kodon 54 (B) ve kodon 57 (C) varyantları üçlü heliksin içindeki glisin'in dikarboksilik asit aracılığı ile yer değiştirmesi sonucunda olur. Proteinin önemli bir bölümü bükülür. Kodon 52 (D) varyantı ise, arjininin sisteinle yer değiştirmesi sonucu fazla sistein disülfid bağlarının oluşumu ile gerçekişir. Söz konusu bu varyasyonlardan birinin bulunması durumunda 'O' olarak tanımlanır (12).



Şekil 7.7. *MBL2* geninde yer alan tek nükleotid polimorfizmleri - *Tsutsumi ve ark. (41)*'den alınmıştır.

Serum MBL miktarları her kodlanan genotipte değişiklik gösterir. *MBL2* geninin promotör bölgesindeki ve 5'-kodlanmayan bölgeleri serum MBL düzeyinin değişimine sebep olur. SNP'ler promotör bölgenin -550 (G→C, alleller H ve L), -221 (G→C, alleller X ve Y) ve 5'-kodlanmayan bölgenin 4. nükleotidinde (C→T, alleller P ve Q) bulunur (35). Ayrıca promotörün -427, -349, -336, del (-324'ten -329'a kadar) ve -70 pozisyonlarındaki nükleotid değişiklikleri de MBL serum konsantrasyonunu etkiler. Promotörün -550 ve -221 bölgelerinde bulunan polimorfizmler, HY, HX, LY ve LX haplotiplerini oluşturur. Normal kodlanan bölge (A) ile *cis* olarak kalıtılırlarsa; HYA, LYA ve LXA sırasıyla yüksek, orta ve düşük serum miktarı olarak adlandırılır. Bu promotör haplotiplerinin ekzon 1'deki polimorfizmlerle sıkı bir bağlantısı vardır ve bunun sonucunda HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB ve LYQC haplotiplerini oluştururlar (15,34). (Bkz. Şekil 7.7)

## 7.7. MBL'nin Hastalıklar ile İlişkisi

Kollajen benzeri serum proteini olan MBL, komplement sisteminin aktivasyonunu tetikleyerek konakçı savunmasında önemli bir rol üstlenir. MBL2 geninde saptanmış olan SNP'ler proteinin stabilitesi ve serum konsantrasyon düzeyini etkilemektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda elde edilen veriler ise; MBL2 serum konsantrasyonunun enfeksiyon, otoimmün, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık faktörü olduğunu göstermektedir (41). Tablo 7.1'de, MBL2 genotipi ile ilişkilendirilen hastalıklar özetlenmektedir.

**Tablo 7.1. MBL2 ile ilişkilendirilen hastalıklar**

1. Otoimmün Hastalıklar	Klinik Bulgu
Systemic Lupus Erythematosus (SLE)	MBL eksikliği bu hastalarda solunum yolu enfeksiyon riskini artırır. Arteriyal tromboz geliştirme riskini artırır (41).
Rhematoid Arthritis (RA)	Klinik çalışmalar MBL genotipi OO olan RA hastalarında, bu genotipi taşımayanlara oranla tahrip edici etkinin daha hızlı geliştiğini göstermiştir (12,41).
Çölyak Hastalığı	Düşük MBL genotipi Çölyak hastalığı ile ve aynı zamanda sekonder otoimmün hastalıkların görülme sıklıklarındaki artış ile bağlantılıdır (39).
2. İnflamatuvar Hastalıklar	
Ulcerative colitis (UC) ve Cohn's Disease (CD)	CD ve kontrol grubu karşılaştırması sonucunda düşük MBL varyant haplotipli bireylerin sayısını UC'lerde düşük bulmuşlardır (UC<CD) (39).
Cystic Fibrosis (CF)	Mutant MBL2 alleli taşıyan hastalar pulmoner fonksiyona daha az yatkındır ve hastalığın son aşamasında hayatta kalma süreleri daha kısadır (11,12).
SIRS/Sepsis	Sepsisli hastaların MBL varyant genotiplerinin sıklığı, sepsis olmayan hastalara göre daha yüksektir(39).
3. Nötropeni	Varyant MBL allellere sahip olan çocuklarda yaban tip çocuklara kıyasla ateşli nötropeni süresinin 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür (12,27,39).

**Tablo 7.1. MBL2 ile ilişkilendirilen hastalıklar (devamı)**

4. Vasküler Bozukluklar	SLE'li hastalarda OO genotipinin arteriyel tromboz için risk faktörü olduğu belirlenmiştir (41).
Kawasaki Hastalığı	Bu hasta grubunda MBL varyasyonlarının sıklığının daha yüksek olduğunu saptanmıştır (39).
Aterosklerozis	Miyokardiyal enfeksiyon gelişme riskinin MBL eksikliği olan bireylerde daha yüksek olduğunu saptanmıştır (39).
5. Obstetrik	RSA'lı çiftlerde MBL eksikliğinin görülme sıklığının yalnızca bayanlarda değil, aynı zamanda erkek partnerlerinde de yüksek olduğu bulunmuştur (39).
Chorioamnionitis	Spontan preterm doğum yapan kadınlarda B allelinin bu hastalıkla ilişkili olduğunu bulunmuştur (39).
6. Viral Enfeksiyonlar	
Viral Hepatit	Kodon 54 polimorfizmi ve -221 promotör polimorfizmi'nin HBV hastalığının nedenlerinden en az biri ile ilişkili olduğunu görülmüştür (6). Kodon 52'deki polimorfizminin beyaz ırkta HBV kazanımı ile ilişkili olduğu görülmüştür (6). HCV hastalarında bir tane B allelinin olmasının, hastalığın kronik aktif hepatit veya siroza ilerleyişini artırdığı saptanmıştır (6,12).
HIV	MBL varyant allelleri açısından homozigot olan bireylerin HIV enfeksiyonuna yakalanma riskinin de yüksek olduğu saptanmıştır (12,27).
7. Bakteriyal Enfeksiyonlar	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MBL eksikliğinin tüberküloza karşı koruyucu etki sağladığı görülmüştür (10,30).
<i>Neisseria meningitidis</i>	MBL varyant allelleri ile hastalığın ilişkili olduğunu gösterilmiştir (13).
8. Fungal Enfeksiyonlar	Düşük MBL miktarının nekroza sebep olan pulmoner <i>Aspergillus</i> 'e neden olduğu görülmüştür (45).

## 7.8. MBL'nin Preterm Doğum ile İlişkisi

Preterm doğum, serviks, fetus, fetal membran, plasenta ve myometriümda meydana gelen patolojik olaylara bağılı olarak erken gestasyonel süreçte gebeliğin sonlanmasıdır (37<hafta). Gebelik, maternal ve fetal inhibitörlerin dengede olduğu, uterin faktörlerinin baskılandığı bir süreçtir. Doğum ise, baskılanmış uterus faktörlerinin kontraktile hale gelmesi ve fetusun doğum kanalına gelmesine olanak sağlayıcı biçimde serviksin genişlemesi ile gelişen fizyolojik bir süreçtir (4,8).

Preterm doğumlar, intrauterin enfeksiyon, uteroplazental iskemi, hemoraj, "uterine over distension", servikal hastalıklar, stres, endokrin bozukluklar ve proinflatuar mediatörlerin fazla ifadelenmesinden kaynaklanan multifaktöriyel bir sendrom olarak tanımlanabilir (8).

Bu patolojik durumda özellikle maternal-fetal arayüz inflamatuvar faktörleri önemlidir. Preterm doğumların başlıca nedeni intrauterin enfeksiyonlardır. Söz konusu bu enfeksiyonlar doğal bağışıklık sistemini aktive ederler. Mikroorganizmalar patern tanıma reseptörü olan TLR'ler tarafından tanınırlar ve inflamatuvar sitokinlerin sentezlenmesini sağlarlar. Mikrobiyal endotoksinler ve proinflatuar sitokinler prostaglandin sentezini arttırmalarına ek olarak, matriksi degrade edici enzim sentezi ve fetal membranların rüptürü ile uterus kontraksiyonunu da tetikleyerek doğumu başlatırlar (8).

İnflamasyonun doğumdaki rolü makrofaj ve nötrofillerin myometriüme doğru hareketleri ile de kanıtlanmaktadır. Söz konusu inflamatuvar, hücrelerin "inflüksına" ve sitokin mRNA'sının sentezlenmesine eşlik eder. Proteomiks çalışmaları, doğum sürecinde "upregülasyona" en çok sitokinlerin uğradığını göstermektedir (8).

MBL2 ise doğal bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan bir proinflatuar moleküldür. Patojenler üzerinde bulunan karbohidratlara bağlanarak komplement sisteminin lektin yolağının aktive edilmesini sağlar. MBL eksikliği opsonizasyon bozukluğuna neden olmakta ve özellikle immün kompetan bireylerde reküran enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yenidoğanların immün sistemleri de baskılanmış sayılır. Çünkü adaptif immüniteleri gelişmemiştir ve savunma sistemleri maternal antikora ve doğal bağışıklık sistemine bağlıdır. Bu durum da yenidoğanlarda sık görülen enfeksiyonların başlıca nedenidir (8).

Neonatal yoğun bakım ünitesine en sık başvuran hasta grubu ise “prematüre” doğan bebeklerdir. Yenidoğan bebeklerde yapılan bir çalışma; doğumdan bir hafta sonra MBL konsantrasyonunun hem term hem de preterm bebeklerde arttığını göstermiştir. Düşük MBL konsantrasyonu ise düşük gestasyonel yaş ile ilişkilendirilmiştir (17).

## 8. GEREÇ VE YÖNTEM

### 8.1. Gereçler

#### 8.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Trizma Baz (*Sigma T6066*), Borik Asit (*Sigma B6768*), EDTA (*Sigma E5134*), NaCl (*Sigma S3014*), SDS (*Sigma S3014*), Proteinaz K (*Sigma P2308*), Fenol (*Sigma P4557*), Kloroform (*Sigma C2432*), İzoamilalkol (*Sigma I-9392*), Agaroz (*Sigma A5093*), Agaroz Wide Range/Standard 3:1 (*Sigma A7431*), Tris-Asetat-EDTA Tamponu (*Sigma T8280*), %100 EtOH (*Riedel-de Haën*), Primer (*Alpha DNA*), dNTP (*Roche 11814362001*), Taq DNA polimeraz (*Roche 11596594001*), CfoI (*Roche 10688541001*), MbolI (*MBI-Fer ER0822*), BshNI (*MBI-Fer ER1001*), MgCl<sub>2</sub> (*Sigma M1028*), DMSO (*Sigma D8418*), Amonyum persülfat (APS) (*Sigma A9164*), Akrilamid (*Sigma A9099*), Bisakrilamid (*Sigma M2022*), Orange G (*Sigma Q3756*), Etidium Bromür (10 mg/ml) (*Sigma E1510*), TEMED (*Sigma T9281*), 50 bç. DNA ağırlık belirleyici (*Fermentas SM0371*), pUC8 DNA ağırlık belirleyici (*Fermentas SM0301*), 6X yükleme boyası (*Fermentas R0611*)

#### 8.1.2. Tampon ve Çözeltiler

##### Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler:

- **10mM Tris-1mM EDTA:**

Tris	25 ml 0,2 M Tris (242 g Trizma Baz + 1 L dH <sub>2</sub> O; (pH:8.0)
EDTA	1 ml 0,5 M EDTA (163,6 g EDTA + 1 L dH <sub>2</sub> O; (pH:8.0)
dH <sub>2</sub> O	474 ml

- **1 M NaCl**

NaCl	1,45 g
dH <sub>2</sub> O	25 ml

- **%10 SDS**

SDS 2,5 g

dH<sub>2</sub>O 25 ml

- **Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1)**

Fenol 100 ml

Kloroform 96 ml

İzoamilalkol 4 ml

- **%100 EtOH**

- **Proteinaz K (10 mg/ml)**

Proteinaz K 100 mg

dH<sub>2</sub>O 10 ml

### **Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan çözeltiler:**

- **%10 DMSO**

DMSO 10 ml

dH<sub>2</sub>O 90 ml

- **25 mM MgCl<sub>2</sub>**

- **10X Taq Buffer**

### **Agaroz Jel Elektroforezi:**

- **0,5X TAE**

Tris-Asetat-EDTA Tamponu 100 ml

dH<sub>2</sub>O 2 L

- **Etidium Bromür**

Etidium Bromür 500 µl

dH<sub>2</sub>O 750 µl

- **50 bç. DNA ağırlık belirleyici**

DNA marker 1 µl

6X Yükleme boyası 1 µl

dH<sub>2</sub>O 5 µl



- **Yükleme Tamponu**

Gliserol 55 ml

1X TAE 45 ml

Orange G 0,1 g

### **Poliakrilamid Jel Elektroforezi:**

- **Akrilamid/Bisakrilamid (29:1)**

- **%10 APS**

APS 0,5 g

dH<sub>2</sub>O 5 ml

- **5X TBE**

Trizma Baz 54 g

Borik Asit 27,5 g

0,5M EDTA 20 ml

dH<sub>2</sub>O 1 L

- **1X TBE**

5X TBE 200 ml

dH<sub>2</sub>O 800 ml

### **8.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

Kodak EDAS 290 görüntü analiz sistemi

Biorad yatay elektroforez tankı

Cleaver yatay elektroforez tankı

Biorad dikey elektroforez tankı

Biofuge stratos santrifüj

Biofuge pico santrifüj

Nüve FN500 etüv

Nüve EN400 etüv

Thermolyne Maxi MixII vorteks

Bioer XP Thermal Cyclers

## 8.2. Yöntemler

Çalışmamıza, etik kurul izni ve aile onayı alınan 100 term, 83 preterm bebek ve anne katıldı. Çalışma örnekleri, Eylül 2008-Mart 2009 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Ankara, Adana, Konya Uygulama ve Araştırma Merkezleri ile Sağlık Bakanlığı Etlik Zübeyde Hanım Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesinden toplandı.

Tek yumurta ikizi olan ve düşük doğum ağırlıklı bebekler çalışma dışı bırakıldı. Normal vajinal doğum ile sezeryan doğum ayırımı yapılmadı.

Doğumdan önce, annelerin klinik ve obstetrik takipleri (kaçıncı gebelik olduğu, yaşayan bebek sayısı, önceki gebeliklerindeki yaşadığı sorunlar), mevcut risk faktörleri (Erken Membran Rüptürü, Koryoamniyonit, Preeklampsi, Diabetes Mellitus, Gestasyonel Diabetes Mellitus, Plasental Yetmezlik) ve gestasyonel yaşları kaydedildi. Bebeğin doğum ağırlığı ve cinsiyeti not edildi. Doğumdan sonra, yenidoğan yoğun bakım ihtiyacı gösteren term ve preterm bebekler, yoğun bakımda kaldıkları sürece gelişen sorunlar (Respiratuvar Distres Sendrom, Sepsis, Nekrotizan Enterokolit v.b.) yönünden takip edildi.

DNA izolasyonu gerçekleştirilerek kalıtsal faktörlerin incelenmesi amacıyla, kan örneklemeleri için anneden 5 ml kan alınarak 0,072 ml %7.5 K3-etilendiamintetraasetik asit (EDTA) solüsyonu içeren standart tüplere konuldu. Anneden kan alma işlemi hastadan tıbbi nedenlerle kan alınacağı bir zamana denk getirildi. Bebek çıkımı tamamlandıktan hemen sonra, steril şartlarda cerraha verilmiş olan enjektörle umbilikal kord'dan 5 ml kan örneği alınması istendi. Kan örneği 0,072 ml %7.5 EDTA solüsyonu içeren standart tüplere konulduktan sonra, soğuk zincir şartlarına uyularak, DNA değerlendirilmeleri yapılmak üzere Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı laboratuvarlarına götürüldü.

### 8.2.1. Genomik DNA izolasyonu

#### Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

1. 500 µl'lik kan örnekleri 1.5 ml'lik epperdorf tüplere konulur.
2. Üzerlerine 750 µl Tris-EDTA solüsyonu eklenerek çok iyi karışması sağlanır. 12.000 rpm'de 3 dk santrifüjlenir.
3. Üst faz atıldıktan sonra, 2. tur lizis tamponu ile bir kez daha yukarıda bahsedilen işlem tekrarlanır.
4. 3. ve 4. turlar için ise, 500 µl Tris-EDTA solüsyonu eklenir ve 12.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenir.
5. 4. tur sonunda üst faz atılır ve her bir tüpe;
  - 300 µl Tris-EDTA,
  - 150 µl 1M NaCl
  - 150 µl %10'luk SDS
  - 100 µl Proteinaz Keklenir.
6. 37°C'de 1 gece bekletilir.
7. Her bir tüpe 450 µl Fenol-Kloroform-İzoamilalkol eklenir ve vorteks yapılır.
8. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında üst faz yeni tüplere aktarılır.
9. 800 µl %100'lik EtOH eklenir.
10. 3 saat -20°C'de bekletildikten sonra, 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir ve alkol fazı dökülür.

11. Alkolü tamamen uçurmak için tüpler kapakları açık bırakılarak 37°C'lik kuru blokta bekletilir.

12. DNA'lar 150 µlt dH<sub>2</sub>O çözümlenerek kullanılacakları güne kadar -86°C'de bekletilir.

### 8.2.2. MBL2 genotiplenmesi

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

*MBL2* geninin kodon 52, 54 ve 57 polimorfizmleri belirlenmesinde kullanılan primer dizisi Tablo 8.1'de verilmiştir.

**Tablo 8.1. MBL2 geni kodon 52, 54 ve 57 PZR için kullanılan primer dizileri**

Polimorfizm	Primer Dizisi
<b>Kodon 52</b>	5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGATGCG-3'- F 5'-CAGGCAGTTTCTCTGGAAGGTAAAG-3'-R
<b>Kodon 54</b>	5'-ATAGCCTGCACCCAGATTGTAG-3'- F 5'-AGAGACAGAACAGCCCAACAC-3'-R
<b>Kodon 57</b>	5'-ATAGCCTGCACCCAGATTGTAG-3'- F 5'-AGAGACAGAACAGCCCAACAC-3'-R

PZR'lar, son hacim 30 µlt olacak şekilde 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) ve 5 U/µlt Taq DNA polimeraz kullanılarak hazırlanmıştır.

PZR ürünleri kodon 54 ve 57 için sırasıyla *BanI* ve *MboII* kesim enzimleri kullanılarak kesilmiştir. PZR ürünlerinin amplifikasyonu, etidyum bromür (EtBr) ile boyanmış % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

**PZR koşulları:**

94°C'de 5 dakika

94°C'de 30 saniye

54°C'de 45 saniye

72°C'de 45 saniye

72°C'de 5 dakika

} 35 döngü

Kodon 52'deki polimorfizmler için kullanılan primer dizisi Tablo 8.1'de verilmiştir. PZR son hacmi 30 µlt olacak şekilde 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (her bir dNTP'nin son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde) ve 5 U/µlt Taq DNA polimeraz kullanılarak hazırlanmıştır.

**PZR koşulları:**

94°C'de 5 dakika

94°C'de 45 saniye

65°C'de 45 saniye

72°C'de 45 saniye

72°C'de 7 dakika

} 35 döngü

Çalışmamızda kodon 52, 54 ve 57 polimorfik bölgelerinin analizinde uyguladığımız PZR yöntemi için örneklerin hazırlanması Tablo 8.2 verilmiştir.

**Tablo 8.2. PZR protokolü**

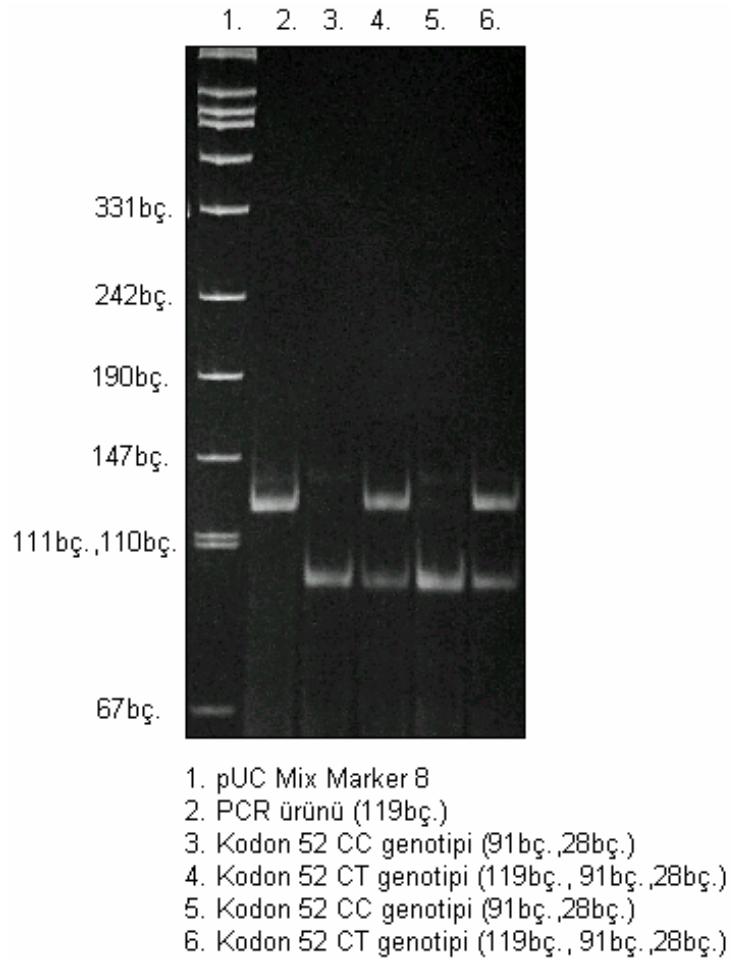
<b>PZR Master Mix</b>		<b>Son Konsantrasyon</b>
dH <sub>2</sub> O	15 µlt	
10X Taq Buffer	5 µlt	1X
dNTP (10 mM)	1 µlt	200 µM/her bir dNTP
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µlt	2,5mM
Primer "Forward" Primer "Reverse"	0,75 µlt 0,75 µlt	10 pmol/µlt 10 pmol/µlt
Taq Polimeraz (5u/µlt)	0,25 µlt	1,25 u
%10 DMSO	2,5 µlt	%8
Genomik DNA	2,5 µlt	100-200 ng

### **Restriksiyon Fragman Analizi (RFLP)**

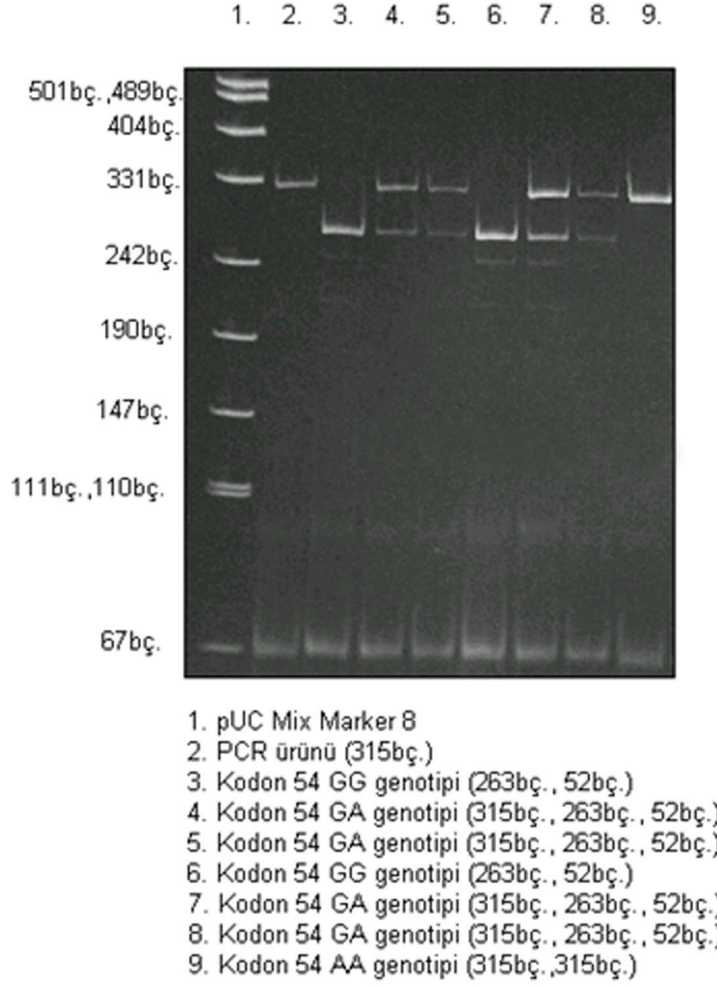
%12'lik poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülen restriksiyon enzim kesim ürünleri EtBr ile boyanarak, görüntülemesi **Kodak EDAS 290** ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 8.3'de kesim paternleri ile ilgili bilgi verilmektedir.

**Tablo 8.3. RFLP analizinde kullanılan enzimler ve kesim paternleri**

<b>Kesim Enzimi</b>	<b>Kesim Paterni</b>
<i>HhaI</i> (33)	CC:91bç,28bç CT:119bç,91bç,28bç TT:119bç
<i>BanI</i> (25)	GG:263bç,52bç GA:315bç,263bç,52bç AA:315bç
<i>MboII</i> (25)	GG:315bç GA:315bç,272bç,43bç AA:272bç,43bç.

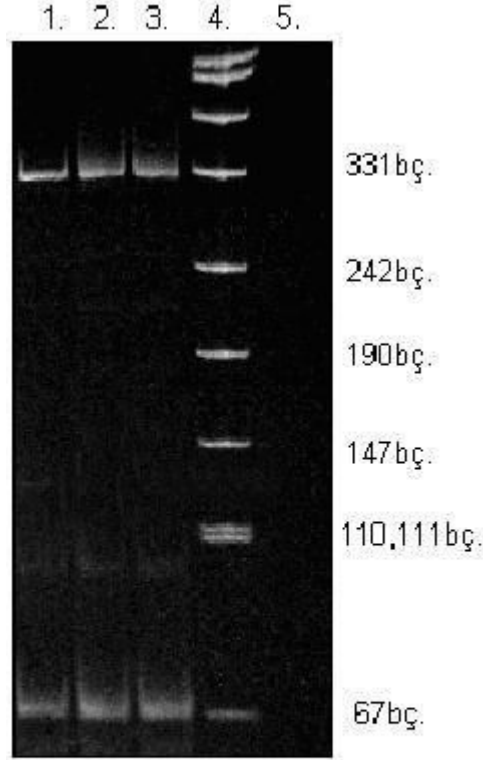


**Şekil 8.1. MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 52 polimorfizminin 119 bç'lik DNA parçasının *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü. 1. kuyu, DNA pUC 8 ağırlık belirleyici. 2. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (119bç.), 3. ve 5. kuyu, *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesilen örnekler; CC genotipi (91bç. ve 28bç.), 4. ve 6. kuyu, *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesilen örnekler; CT genotipi (119bç., 91bç. ve 28bç.)**



**Şekil 8.2.** MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 54 polimorfizminin 315 bç'lik DNA parçasının *BanI* restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü. 1. kuyu, DNA pUC 8 ağırlık belirleyici. 2. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (315bç.), 3. ve 6. kuyu, *BanI* restriksiyon enzimi ile kesilen örnekler; GG genotipi (263bç. ve 52bç.), 4., 5., 7.ve 8. kuyu, *BanI* restriksiyon enzimi ile kesilen örnekler; GA genotipi (315bç., 263bç. ve 52bç.)





1. Kodon 57; PCR ürünü (315bç.)
2. Kodon 57; GG genotipi (315bç.)
3. Kodon 57; GG genotipi (315bç.)
4. pUC Mix Marker 8
5. Negatif kontrol

**Şekil 8.3. MBL2 geninin ekzon 1'inde yer alan kodon 57 polimorfizminin 315 bç'lik DNA parçasının *MbolI* restriksiyon enzimi ile kesiminin PAGE görüntüsü. 1. kuyu, kesilmemiş PZR ürünü (315bç.), 2. ve 3. kuyu, *MbolI* restriksiyon enzimi ile kesilen örnekler; GG genotipi (315bç.), 4. kuyu, DNA pUC 8 ağırlık belirleyici, 5. kuyu, negatif kontrol.**

### 8.2.3. İstatistiksel Analiz

Genotipler ile çalışma popülasyonu (term-preterm) arasındaki ilişkinin analizinde, Pearson ki-kare testi ve Binary Lojistik Regresyon analizi kullanılmıştır. Alleller ve çalışma popülasyonu arasındaki ilişki, Fisher-Exact testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelere ilişkin sonuçlar n, % ve Odds oranı (OR) olarak ifade edilmiştir.  $p < 0,05$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için **SPSS 13.0** (*Chicago IL, USA*) istatistik yazılımı kullanılmıştır.

## 9. BULGULAR

Çalışmamıza ilgili hastanelerde doğan, anne yanında ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinde izlenen 183 bebek ve annesi alındı. Çalışma grubu, 83 prematür ve 100 term yenidoğanı kapsamaktadır. Grupların demografik özellikleri Tablo 9.1'de verilmiştir.

**Tablo 9.1. Preterm ve Term grubunun anne yaşı, gravida, para, gebelik haftası, doğum ağırlıkları ve cinsiyeti**

		<b>Term (n=100)</b>	<b>Preterm (n=83)</b>	<b>p</b>
<b>Anne Yaşı (yıl)*</b>		25,9±5,2	29,7±5,5	0,000
<b>Gebelik Haftası*</b>		38,8±1,2	30,2±2,7	0,000
<b>Doğum Ağırlığı*</b>		3306±423	1471±659	0,000
<b>Cinsiyet (kız/erkek)</b>		57/43	45/38	0,41
<b>Gravida n (%)</b>	1	38,2	50,6	0,399
	2	42,2	32,6	
	3	12,7	8,4	
	4	4,9	3,6	
	5	1	3,6	
	6	1	1,2	
<b>Para (n%)</b>	1	79,4	53	0,001
	2	13,7	33	
	3	5,9	11	
	4	1	3	

\* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Prematüre ve term kontrol grubu karşılaştırıldığında anne yaşı, gebelik haftası, doğum ağırlığı ve para açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanırken ( $p < 0,001$ ), gravida ve cinsiyet açısından anlamlı farklılık bulunmadı.

Term grubundaki annelerin eski gebeliklerinin %11,8'i abortusla, %3'ü intrauterin exitusla sonuçlanmış, %2'sinde fetal anomalili bebek doğmuştur. Preterm grubundaki annelerin eski gebeliklerinin %4,8'i intrauterin exitus ve %21 abortusla sonuçlanmıştır. Gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı Tablo 9.2'de verilmiştir.

**Tablo 9.2. Örneklem alınan gebeliklerdeki sorunların gruplara göre dağılımı**

	<b>Term (n=100), n(%)</b>	<b>Preterm (n=83), n (%)</b>	<b>p</b>
<b>EMR</b>	3	42	0,000
<b>Koryoamnionit</b>	0	10,8	0,001
<b>Preeklampsi</b>	3	27	0,000
<b>Diabetes Mellitus</b>	2	7,2	0,033
<b>Plasental Yetmezlik</b>	1	21	0,000
<b>Oligohidroamnios</b>	1	1,2	0,574
<b>Polihidroamnios</b>	1	0	0,574
<b>Fetal Distress</b>	3	1,2	0,211
<b>rh/rh Uyumsuzluğu</b>	1	1,2	0,574
<b>Gestasyonel Diabetes Mellitus</b>	1	3,6	0,033

Prematüre grubundaki annelerden, gebeliklerdeki sorunların her biri term kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, EMR, koryoamnionit, preeklamsi, diabetes mellitus, gestasyonel diabetes mellitus ve plasental yetmezlik açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken; oligohidroamnios, polihidroamnios, fetal distress ve rh/rh uygunsuzluğu açısından fark bulunmadı. Kontrol term grupta %3 bebek mekonyumlu doğdu.

**Tablo 9.3. Term ve preterm bebeklerin yoğun bakım izlemindeki sorunlarının gruplara göre dağılımı**

	<b>Term (n=100), n (%)</b>	<b>Preterm (n=83), n (%)</b>	<b>p</b>
<b>Erken Neonatal Sepsis</b>	1	40,9	0,000
<b>Geç Neonatal Sepsis</b>	1	31,3	0,000
<b>BPD</b>	0	14,4	0,000
<b>NEK</b>	0	15,6	0,000
<b>ROP</b>	0	8,4	0,03
<b>Konjenital Anomali</b>	3	1	0,211
<b>RDS</b>	0	34,9	0,000

Tablo 9.3'de term ve preterm bebeklerin yoğun bakım sorunları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Prematüre bebeklerin klinik izlemlerinde erken neonatal sepsis, geç neonatal sepsis, BPD, NEK, ROP ve RDS görülme sıklığı açısından term kontrol gruba karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Prematüre bebeklerin laboratuvar izleminde %21,6 lökopeni ve %27,7 trombositopeni saptandı. Prematüre bebeklerin yoğun bakım izleminde %3,6 akut böbrek yetmezliği, %1,2 hemolitik anemi, %1,2 grade 4 intrakranial

kanama, %1,2 kolestaz saptandı. Konjenital anomali açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı.

MBL2 kodon 52, 54 ve 57 polimorfizmleri Hardy-Weinberg dengesindeydi. Maternal term ve preterm gruplar karşılaştırıldığında, kodon 54 polimorfizmi açısından istatistiksel olarak farklılık saptanırken, kodon 52 ve 57 polimorfizmleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı. Fetal term ve preterm gruplar karşılaştırıldığında, kodon 52, 54 ve 57 polimorfizmleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı. Fetal-maternal MBL2 genotiplerinin dağılımı Tablo 9.4'te verilmiştir.

**Tablo 9.4 Fetal-maternal MBL2 genotiplerinin dağılımı**

	ANNE				BEBEK			
	Genotip	Term n=100 n (%)	Preterm n=83 n (%)	<i>p</i>	Genotip	Term n=100 n (%)	Preterm n=83 n (%)	<i>p</i>
Kodon 52	CC	84 (56,8)	64 (43,2)	0,261	CC	86 (54,8)	71 (45,2)	1,00
	CT	16 (45,7)	19 (54,3)		CT	14 (53,8)	12 (46,2)	
	TT	—	—		TT	—	—	
	Allel				Allel			
	C	184	147	0,288	C	186	154	1,00
	T	16	19		T	14	12	
Kodon 54	GG	67 (49,6)	68 (50,4)	0,045	GG	66 (55,9)	52 (44,1)	0,294
	GA	28 (71,8)	11 (28,2)		GA	26 (48,1)	28 (51,9)	
	AA	5 (55,6)	4 (44,4)		AA	8 (72,7)	3 (27,3)	
	Allel				Allel			
	G	162	147	0,059	G	158	132	1,00
	A	38	19		A	42	34	
Kodon 57	GG	100 (100)	83 (100)	1,00	GG	100 (100)	83 (100)	—
	GA	—	—		GA	—	—	
	AA	—	—		AA	—	—	
	Allel				Allel			
	G	200	166		G	200	166	
	A	—	—		A	—	—	

Genotipler ile çalışma popülasyonu arasındaki ilişkinin anlamlı bulunduğu maternal kodon 54 için hesaplanan OR değerleri tablo 9.5’de görülmektedir.

**Tablo 9.5. Maternal kodon 54 için binary logistik regresyon analizi sonuçları**

Genotip	Term n=10, n (%)	Preterm n=83, n (%)	p	Odds Oranı (Odds Ratio, OR)	p	Güven Aralığı (Confidence Interval, CI)
GG	67 (49,6)	68 (50,4)	<b>0,045</b>	1,306	<b>0,700</b>	0,336- 5,072
GA	28 (71,8)	11 (28,2)		0,491	<b>0,349</b>	0,111- 2,175
AA	5 (55,6)	4 (44,4)		—	—	—

Maternal ve fetal MBL2 kodon 52 polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.6 ve 9.7’de gösterilmiştir. Her iki grupta da ortak CC oranı diğerlerinden yüksek bulunmuştur (%77) ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.

**Tablo 9.6. Fetal-maternal kodon 52 polimorfizminin term grupta dağılımı**

		Bebek n=100, n (%)				
		Kodon 52				
		CC	CT	TT	p	
Anne n=100 n (%)	Kodon 52	CC	77 (77)	7 (7)	—	0,001
		CT	9 (9)	7 (7)	—	
		TT	—	—	—	

**Tablo 9.7. Fetal-maternal kodon 52 polimorfizminin preterm grupta dağılımı**

		Bebek n=83, n (%)				
		Kodon 52				
		CC	CT	TT	p	
Anne n=83 n (%)	Kodon 52	CC	60 (72,3)	4 (4,8)	—	0,001
		CT	11 (13,3)	8 (9,6)	—	
		TT	—	—	—	

Maternal ve fetal kodon 54 polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.8 ve 9.9'da gösterilmiştir. Term grubunda anlamlı farklılık bulunmazken, preterm grupta ortak GG oranı diğerlerinden yüksek bulunmuştur (%59) ve istatistiksel olarak farklılık saptanmıştır.

**Tablo 9.8. Fetal-maternal kodon 54 polimorfizminin term grupta dağılımı**

		Bebek n=100, n (%)				p
		Kodon 54				
		GG	GA	AA		
Anne n=100 n (%)	Kodon 54	GG	49 (49)	13 (13)	5 (5)	0,225
		GA	15 (15)	11 (11)	2 (2)	
		AA	2 (2)	2 (2)	1 (1)	

**Tablo 9.9. Fetal-maternal kodon 54 polimorfizminin preterm grupta dağılımı**

		Bebek n=83, n (%)				p
		Kodon 54				
		GG	GA	AA		
Anne n=83 n (%)	Kodon 54	GG	49 (59)	18 (21,7)	1 (1,2)	0,001
		GA	3 (3,6)	7 (8,4)	1 (1,2)	
		AA	0	3 (3,6)	1 (1,2)	

Maternal ve fetal kodon 57 polimorfizminin term ve preterm gruplardaki dağılımı, sırasıyla Tablo 9.10 ve 9.11'de gösterilmiştir. Her iki grupta da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.



**Tablo 9.10. Fetal-maternal kodon 57 polimorfizminin term grupta dağılımı**

		<b>Bebek n=100, n (%)</b>				
		<b>Kodon 54</b>				
			<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>p</b>
<b>Anne n=100 n (%)</b>	<b>Kodon 57</b>	<b>GG</b>	100 (100)	100 (100)	—	—
		<b>GA</b>	100 (100)	100 (100)	—	

**Tablo 9.11. Fetal-maternal kodon 57 polimorfizminin preterm grupta dağılımı**

		<b>Bebek n=83, n (%)</b>				
		<b>Kodon 57</b>				
			<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>p</b>
<b>Anne n=83 n (%)</b>	<b>Kodon 57</b>	<b>GG</b>	83 (100)	83 (100)	—	—
		<b>GA</b>	83 (100)	83 (100)	—	
		<b>AA</b>	—	—	—	

## 10. TARTIŞMA

Yenidoğanın post-natal çevreye adaptasyonu, sağlıklı bir yaşamın temelini oluşturmaktadır. Bu süreçte, sık karşılaşılan sorunların başında yenidoğan enfeksiyonları gelmektedir. İntrauterin yaşamda plasenta ve daha sonra da anne sütü ile alınan Ig'lere karşı söz konusu süreçte, immün sistemin immatür olması, yenidoğan enfeksiyonlarına yatkınlığın başlıca nedenidir. Özellikle, maternal IgG repertuarının enfekte eden özgül molekülleri tanımadığı durumlarda, immün sistemin bir parçası olan doğal bağışıklık önemli rol oynar. Yetişkinler ile karşılaştırıldığında, yenidoğanlarda değişen hücre yüzey reseptör ifadenmesi, uyarılara değişen yanıtlar, düşük serum IgM ve IgA düzeyine ek olarak bozulan antijen sunumu gerçekleşir. Önceleri TLR ligandlarına yenidoğan monositlerinin düşük reaktivite vermesinin nedeni olarak, bu dönemdeki düşük TLR ifadenmesi düşünülmekteydi. *Levy ve ark. (2004)* ise, monositlerin düşük reaktivite vermesinin, reseptör ifadenmesindeki düşüklükten kaynaklanmadığını, bu olayın "soluble" serum faktörlerinden kaynaklandığını bildirmiştir. Yenidoğanlarda, kompleman faktör konsantrasyon ve aktivitesinin yetişkinlere göre daha düşük olması nedeni ile opsonik ve bakterisidal aktivite tam verimli olarak çalışmamaktadır. Özellikle yenidoğanların T bağımsız polisakkarit antijenlerine verdikleri düşük yanıt, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık nedenidir. Adı geçen antijenlere özgül antikor üretimindeki düşük kapasite, lektin yolağının yenidoğan döneminde önemini göstermektedir (35).

Yenidoğan döneminde immün sistemin tam olarak gelişmemesine bağlı karşılaşılan komplikasyonlara ek olarak, yenidoğanın "prematüre" olması ise, prenatal mortalite ve morbidite hızını arttıran başlıca faktör olması ve %9 görülme sıklığı nedeni ile modern perinatal tıbbın çözmeye çalıştığı önemli bir sorundur (23). Preterm doğuma bağlı gelişen komplikasyonlar arasında serebral hemoraji, serabral palsi, bronkopulmoner displazi ve retinopati yer almaktadır. İntrauterin büyüme geriliğinde olduğu gibi prematüre doğumlar da sosyal, çevresel, tıbbi ve kalıtsal faktörlere bağlıdır. Bu sorunun patogenezini

aydınlatmaya yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, gestasyonel yaşın önemli belirteçleri arasında “maternal-fetal” gen varyasyonlarının önemi vurgulanmaktadır (5).

Periodontitis ve sistemik otoimmün hastalıklar gibi artan inflamasyonun olduğu koşullar ile preterm doğumlar arasındaki ilişkiyi vurgulayan çalışmalar, “inflamasyonun” gestasyonel süreci etkilemesi nedeni ile preterm etkeni olarak kabul edilmesine neden olmuştur (23). Elde edilen bu veriler ile uyumlu olarak, inflamatuvar yanıtın oluşmasında rolü olan proteinleri kodlayan genlerdeki varyasyonlar da preterm doğumlara yatkınlık sağlayabilir.

Lektin yolağında işlevsel olan MBL, karaciğerden sentezlenen ve hipogammaglobulinemik fazda doğal bağışıklıkta rol oynayan bir proteindir. Maternal MBL serum seviyesinin hamileliğin ilk trimestirinde artışına ek olarak, nidasyon, plasentasyon ve hamileliğin devamlılığında da MBL'nin işlevsel olduğunun anlaşılması, söz konusu proteini gebelik komplikasyonları– inflamasyon ilişkisinin aydınlatılmasında, hedef moleküllerden biri haline getirmiştir (9,38,43). Proinflamatuvar bir molekül olan MBL2 eksikliğinin çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Serum düzeyindeki farklılık ise, genin polimorfik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Preterm doğumlarda maternal MBL2 genotipinin etken olabileceği ise ilk kez *Anells ve ark. (2004)* tarafından gösterilmiştir (3). Başka çalışmalarda ise, fetal MBL2 genotipinin preterm doğumlarla ilişkisi araştırılmıştır (41).

Bilindiği gibi, maternal antikorlar plasentadan aktif şekilde fetusa taşınarak pasif bağışıklığı sağlar. Buna karşılık, gebelik sırasında trofoblastların maternal periferik dolaşıma çıktığı bilinmektedir. Bu bulguların gestasyonel sürecin belirlenmesinde, fetal ve maternal faktörlerin bir arada ve uyumlu çalışmasını göstermesi nedeni ile, çalışmamızda literatürde bulunan önceki çalışmalardan farklı olarak fetal-maternal MBL2 kodon 52, 54 ve 57 genotipinin preterm doğumlarla ilişkisi araştırılmıştır.

Genlerin promotör bölgelerinde tanımlanan polimorfizmlerin, transkripsiyon hızını etkileyerek, genin ürünü olan proteinin düzeyini etkilemesi bilinen bir mekanizmadır. Kodlama bölgesinde meydana gelen varyasyonlar ise, “*trans-acting*” elemanların bağlanma bölgesinde değişiklik yaratarak transkripsiyon hızını etkiler. Bu çalışmada incelenen polimorfizmler ise, MBL2 proteininin homopolimer özelliğini bozarak ve sitoplazmada degradasyona açık hale getirerek, ilgili proteinin serum düzeyinin düşmesine neden olmaktadır (43).

*MBL2* geninde kodon 57 polimorfizmi olarak da adlandırılan 239 G/A varyantı (D alleli) non-polar yan gruba sahip olan glisinin, negatif yüklü yan gruba sahip glutamik asite dönüşmesine neden olmaktadır. Çalışmamızda, D alleli gerek çalışma grubu ve gerekse de kontrol grubunda gözlenmemiştir. Bu bulgumuz kodon 57 polimorfizm frekansının Türk popülasyonu için 0.00 olarak tanımlanmasına neden olmuştur. *Gerçeker ve ark. (2003)* çocukluk çağı reküran akciğer enfeksiyonlarında da benzer bir bulgu bildirmiştir. Bu bulgunun sebebi, söz konusu lokusun Güney Afrika popülasyonuna ait olmasıdır. Ayrıca bu bulgu, popülasyonlar arası genetik havuz farklılığını vurgulayarak, polimorfizm çalışmalarının her popülasyona özgü olarak yapılması gerekliliğini göstermektedir (30).

*MBL2* geninde kodon 54 polimorfizmi olarak da adlandırılan 230 G/A varyantı (B alleli) glisinin, aspartik asite dönüşmesine neden olmaktadır. Bu değişim non-polar alifatik yapıdaki glisin’in, negatif yüklü yan gruba sahip olan aspartik asit’e dönüşmesine neden olur. Amino asitlerde oluşan bu yük değişimi ise, protein-protein etkileşmesindeki değişimden sorumludur. Çalışmamızda, term doğumlarda maternal kodon 230 G/A genotipinin preterm doğum yapan annelere göre, anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p < 0.045$ ). Bu bulgu maternal 230 G/A genotipinin bir heterozis olduğunu göstermektedir. Bulgumuz *Anells ve ark. (2004)* tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmektedir (3).

Gebelik, inflamasyonun arttığı bir süreçtir. Bu nedenle, inflamasyonun süresi ve büyüklüğünde gen polimorfizmleri önemli rol oynamakta ve preterm doğumları tetiklemektedir. Proinflamatuvar bir protein olan MBL2'nin yüksek düzeyde olması da erken doğumu tetikleyebilecek bir faktördür. Maternal 230 G/A genotipine sahip olan bireylerde düşük düzeyde serum MBL2 tespit edilmiştir. Bu da inflamatuvar yanıtın baskılanması ve dolayısı ile gestasyonel sürecin uzamasına neden olmaktadır. *Van de Geijn ve ark. (2008)* yüksek MBL üretimine neden olan genotipe sahip kadınların, preterm doğumlara yatkın olduğunu bildirmiştir (43). *Swierzko ve ark. (2008)*'da yaptıkları başka bir çalışma ile bu sonucu doğrulamaktadır (35). *Bodamer ve ark. (2006)* yenidoğanlar üzerinde yaptığı çalışmada ise, fetal MBL2 kodon 54 genotipinin preterm doğum ile ilişkisini saptamamıştır (5).

Çalışmamızda, kodon 54'te preterm grupta fetal-maternal 230 G/A genotipleri karşılaştırıldığında, GG genotipinin pretermlerdeki sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı ( $p < 0.001$ ) olduğu saptanmıştır. Önceki çalışmalardan, MBL2 GG genotipine sahip olan bireylerin yüksek MBL serum düzeyine sahip olduğu bilinmektedir. Bu bulgu yukarıdaki paragrafta da belirtildiği gibi, inflamasyonun arttığı gebelik sürecinde istenmeyen bir durumdur. Proinflamatuvar sitokin düzeyindeki artış gestasyonel süreci kısaltan bir unsur olarak kabul edilmektedir. Bu bulgumuz da, düşük MBL düzeyinin evrimsel süreçte bir avantaj olabileceğini göstermektedir.

Kodon 54'de term doğumlarda fetal MBL2 230 G/A genotipinin etkisi saptanmamıştır.

Bu çalışmada incelenen son MBL2 varyantı ise, kodon 52 223 C>T dönüşümüdür. Bu dönüşüm sonucu, pozitif yüklü bir yan gruba sahip olan arjinin, yüksüz ve polar yan gruba sahip olan sistein'e dönüşmektedir. Maternal term ve preterm gruplar karşılaştırıldığında, kodon 52 genotipinin bir etkisi saptanmamıştır. Term doğumlarda MBL2 223 C/T polimorfizmi maternal-fetal

MBL genotipi ile karşılaştırıldığında, CC genotipinin %77 oranında yüksek olduğu bulunmuştur. Pretermde ise, bu oran %72,3 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu, çalışılan bölgeye yakın bir yerde başka bir polimorfizm olabileceğini veya başka bir gen polimorfizmi ile bu bölgenin bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Gestasyonel sürecin devamlılığını sağlayabilmek için hem fetal immünitinin tanınması, hem de maternal immünitinin baskılanması gereklidir. Söz konusu bu baskılanmada, hem fetal ve hem de maternal faktörlerin rolü oldukça önemlidir. Bu baskılanma sürecinde oluşan değişikliğe bağlı olarak, gestasyonel süreç etkilenecek preterm doğumlarını tetikleyebilmektedir (5). Gestasyonel süreçte rolü olan inflamatuvar proteinleri kodlayan genlerin incelenmesi ile popülasyonlara özgü veri tabanları oluşturulması gereklidir. Çünkü genin ifadenmesinde çevresel faktörlerin de önemli rol oynadığı bilinmektedir (4). Bu çalışmaların devamı ile topluma özgü verilerin elde edilmesi ve risk altındaki grupların belirlenmesine ek olarak patogenezindeki mekanizmanın aydınlatılabilmesi sağlanabilir.

## 11. SONUÇ

- Düşük MBL2 düzeyine neden olan kodon 54 G/A heterozigotluğu bir avantajdır.
- Kodon 57 G/A polimorfizmi Türk popülasyonunda yoktur.
- Genin kodlama bölgesinde bulunan polimorfizmlere ek olarak, promotör bölgedeki polimorfizmlerin de çalışılmasına ve MBL2 proteinin etkileştiği MASP-2 proteinini kodlayan gendeki polimorfizmlerin de preterm doğumlarla ilişkisinin araştırılması öngörülmektedir.

## 12. KAYNAKLAR

1. ALUVIHARE, V.R., KALLIKOURDIS, M., BETZ, A.G. (2005). Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med.* **83**: 88-96.
2. AMEGLIO, F., VENTO, G., ROMAGNOLI, C., GIARDINA, B., CAPOLUONGO, E. (2007). Association of MBL2 variants with early preterm delivery. *Genetics in Medicine.* **9**: 136-137.
3. ANNELLS, M.F., HART, P.H., MULLIGHAN, C.G., HEATLEY, S.L., ROBINSON, J.S., BARDY, P., McDONALD, H.M. (2004). Interleukins-1,-4,-6,-10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- $\beta$ , FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* **191**: 2056-2067.
4. BEKSAC, M.S. (1996). Plasenta İmmünolojisi. Fetal Tıp; Prenatal Tanı. Ankara: Medical Network&Nobel. 1. Baskı. Bölüm 2. s.: 22-28.
5. BODAMER, O.A., MITTERER, G., MAURER, W., POLLAK, A., MUELLER, M.W., SCHMIDT, W.M. (2006). Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (*MBL2*) gene polymorphisms and pre-term birth. *Genetics in Medicine.* **8**: 518-524.
6. BROWN, K.S., RYDER, S.D., IRVING, W.L., SIM, R.B., HICKLING, T.P. (2007). Manan binding lectin and viral hepatitis. *Immunology Letters.* **108**: 34-44.
7. CAPOLUONGO, E., VENTO, G., ROCCHETTI, S., GIARDINA, E., CONCOLINO, P., SINIBALDI, C., SANTONOCITO, C., VENDETTUOLI, V., TANA, M., TIRONE, C., ZUPPI, C., ROMAGNOLI, C., NOVELLI, G., GIARDINA, B., AMEGLIO, A. (2007) Mannose-binding lectin polymorphisms and pulmonary outcome in premature neonates: a pilot study. *Intensive Care Med.* **33**: (1787-1794).



8. CHALLIS, J.R., LOCKWOOD, C.J., MYATT, L., NORMAN, J.E., STRAUSS, J.F. 3rd., PETRAGLIA, F. (2009). Inflammation and pregnancy. *Reproductive Sciences*. **16**: 206-215.
9. CHRISTIANSEN, O.B., NIELSEN, H.S., LUND, M., STEFFENSEN, R., VARMING, K. (2009). Mannose-binding lectin-2 genotypes and recurrent late pregnancy losses. *Hum. Reprod.* **24**: 291-299.
10. COSAR, H., OZKINAY, F., ONAY, H., BAYRAM, N., BAKİLER, A.R., ANIL, M., CAN, D., OZKINAY, C. (2008). Low levels of mannose-binding lectin confers protection against tuberculosis in Turkish children. *Eur J Clin Microbiol Dis.* **27**: 1165-1169.
11. DAVIES, J., TURNER, M., KLEIN, N. (2001). The role of the collectin systems in pulmonary defence. *Paediatric Respiratory Reviews*. **2**: 70-75.
12. DOMMETT, R.M, KLEIN, N., TURNER, M.W. (2006). Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Journal compilation*. **68**: 193-209.
13. EISEN, D.P., MINCHINTON, R.M. (2003). Impact of Mannose-Binding Lectin on Susceptibility to Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. **37**: 1496-1505.
14. ENDO, Y., TAKAHASHI, M., FUJITA, T. (2006). Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*. **211**: 283-293.
15. EZEKOWITZ, R.A. (2003). Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. **187**: 335-339.
16. FRAKKING, F. N. J., BROUWER, N., van EIJKELBURG, N. K. A., MERKUS, M. P., KUIJPERS, T.W., OFFRINGA, M., DOLMAN, K.M. (2007). Low mannose-binding lectin (MBL) levels in neonates with pneumonia and sepsis. *Clinical and Experimental Immunology*. **150**: 255-262.

17. FRAKKING, F.N.J., BROUWER, N., ZWEERS, D., MERKUS, M.P., KUIJPERS, T.W., OFFRINGA, M., DOLMAN, K.M. (2006). High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clinical and Experimental Immunology*. **145**: 5-12.
18. GÁL, P., BARNA, L., KOCSIS, A., ZÁVODSZKY, P. (2007). Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunology*. **212**: 267-277.
19. GARRED, P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 1461-1466.
20. GARRED, P., LARSEN, F., MADSEN H.O., KOCH, C. (2003). Mannose-binding lectin deficiency – revisited. *Molecular Immunology*. **40**: 73-84.
21. GARRED, P., LARSEN, F., SEYFARTH, J., FUJITA, R., MADSEN, H.O. (2006). Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes and Immunity*. **7**: 85-94.
22. HILGENDORFF, ANNE., SCHMIDT, R., BOHNERT, A., MERZ, C., BEIN, G., GORTNER, L. (2005). Host defence lectins in preterm neonates. *Acta Paediatrica*. **94**: 794-799.
23. HOLST, D., GARNIER, Y. (2008). Preterm birth and inflammation- The role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **141**: 3-9.
24. JI, XIN., GEWURZ, H., SPEAR, G.T. (2005). Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Molecular Immunology*. **42**: 145-152.
25. KANG, M., WANG, H.W., CHENG, P.X., YIN, Z.D., LI, X.O., SHI, H., HU, X.F. (2006). Lack of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis in a Han population from the Hubei province of China. *Arthritis Research & Therapy*. **8**.
26. KILPATRICK, D.C. (2003). Introduction to mannan-binding lectin. *Biochemical Society*. **31**: 745-747.

27. KLEIN, N.J. (2005). Mannose-binding lectin: do we need it?. *Molecular Immunology*. **42**: 919-924.
28. KOCH, C.A., PLATT, J.L. (2003). Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. *Springer Semin Immunopathol*. **25**: 95-117.
29. NONAKA, M., MA, B.Y., OHTANI, M., YAMAMOTO, A., MURATA, M., TOTANI, K., ITO, Y., MIWA, K., NOGAMI, W., KAWASAKI, N., KAWASAKI, T. (2007). Subcellular localization and physiological significance of intracellular Mannan-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. **282**: 17908-17920
30. OZBAS-GERCEKER, F., TEZCAN, I., BERKEL, I., OZKARA, S., OZCAN, ERSOY, F., SANAL, O., OZGUC, M. (2003). The effect of mannose-binding protein gene polymorphisms in recurrent respiratory system infections in children and lung tuberculosis. *The Turkish Journal of Pediatrics*. **45**: 95-99.
31. PELTIER, M.R. (2003). Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **1**.
32. PLUNKETT, J., MUGLIA, L.J. (2008). Genetic contributions to preterm birth: Implications from epidemiological and genetic association studies. *Annals of Medicine*. **40**: 167-195.
33. RAMASAWMY, R., SPINA, G.S., FAE, K.C., PERREIRA, A.C., NISHIHARA, R., REASON, I.J.M., GRINBERG, M., TARASOUTCHI, F., KALIL, J., GUILHERME, L. (2008). Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease-2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin. Vaccine Immunol*. **10**.
34. SEYFARTH, J., GARRED, P., MADSEN, H.O. (2005). The 'involution' of mannose-binding lectin. *Human Molecular Genetics*. **14**: 2859-2869.
35. SWIERZKO, A., ATKINSON A.P.M., CEDZYNSKI, M., MacDONALD, S.L., SZALA, A., DOMZALSKA-POPADIUK, I., BORKOWSKA-KLOS, M., JOPEK, A., SZCZAPA, J.,

- MATSUSHITA, M., SZEMRAJ, J., TURNER, M.L., KILPATRICK, D.C. (2008). Two factors of the lectin pathway of complement, L-ficolin and manan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Molecular Immunology*.
36. TAKAHASHI, K., IP, W.K.E., MICHELOW, I.C., EZEKOWITZ, R.A.B. (2006). The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Current opinion in Immunology*. **18**: 16-23.
37. THELLIN, O., HEINEN, E. (2003). Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology*. **185**: 179-184.
38. THÉVENON, A.D., LEKE, R.G., SUGUITAN, A.L., JR. ZHOU, J.A., TAYLOR, D.W. (2009). Genetic polymorphisms of mannose-binding lectin do not influence placental malaria but are associated with preterm deliveries. *Infect Immun*. **77**: 1483-1491.
39. THIEL, S., FREDERIKSEN, P.D., JENSENIUS, J.C. (2006). Clinical manifestations of manan-binding lectin deficiency. *Molecular Immunology*. **43**: 86-96.
40. TOSI, M.F. (2005). Innate immune response to infection. *Curr opin Allergy Clin Immunol*. **116**: 241-249.
41. TSUTSUMI, A., TAKAHASHI, R., SUMIDA, T. (2005). Mannose binding lectin: Genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. **4**: 364-372.
42. TURNER, M.W. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*. **40**: 423-429.
43. VAN DE GEIJN, F.E., DOLHAIN, R.J.E.M., VAN RIJS, W., WILLEMSSEN, S.P., HAZES, J.M.W., DE GROOT, C.J.M. (2008). Mannose-binding lectin genotypes are associated with shorter gestational age an evolutionary advantage of low MBL production genotypes? *Molecular Immunology*. **45**: 1514-1518.

44. WALLIS, R. (2007). Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. **212**: 289-299.
45. WORTHLEY, D.L., BARDY, P.G., MULLIGHAN, C.G. (2005). Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*. **35**: 548-555.