

**FİLAGRİN POLİMORFİZMLERİNİN BESİN ALERJİSİ VE  
ATOPIK DERMATİT İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ASSOCIATION OF FILAGGRIN GENE POLYMORPHISMS  
WITH FOOD ALLEGY AND ATOPIC DERMATITIS**

**NEŞE VARDAR**

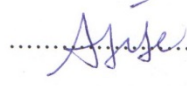
**PROF. DR. EROL AKSÖZ**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

NEŞE VARDAR'ın hazırladığı “Filagrin Polimorfizmlerinin Besin Alerjisi ve Atopik Dermatit İle İlişkisinin Araştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

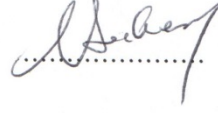
Prof. Dr. Afife İZBIRAK  
Başkan

.....

Prof. Dr. Erol AKSÖZ  
Danışman

.....


Prof. Dr. Cansın SAÇKESEN  
Üye

.....

Prof. Dr. Sibel SÜMER  
Üye

.....

Prof. Dr. Hatice MERGEN  
Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/01/2014

NEŞE VARDAR

## ÖZET

# FİLAGRİN POLİMORFİZMLERİNİN BESİN ALERJİSİ VE ATOPIK DERMATİT İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Neşe VARDAR**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol AKSÖZ**

**Ocak 2014, 57 Sayfa**

Filagrin (*FLG*), deri bariyerinin oluşumunda yer alan ve epidermal farklılaşma kompleksi içerisinde görev alan bir proteindir. Çalışmalar, *FLG* genindeki değişikliklerin alerjen duyarlılığı, alerjik hastalıklardan iktiyozis vulgaris, alerjik rinit, atopik dermatit, besin alerjisi ve astım ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Atopik hastalıkların bir süreç içerisinde birbirleriyle ilişkili oldukları gösterilmiştir. Bu atopik bulguların doğal seyrini ifade eden sürece ‘atopik yürüyüş’ adı verilir. Atopik yürüyüşte genellikle ilk karşılaşılan alerjik hastalık atopik dermatit olup bunu besin alerjisine ait klinik bulgular izler. Atopik dermatit alerjik sürecin başlangıç noktası olarak kabul edilir. Yaşamın daha sonraki yıllarında ise solunum alerjilerine duyarlılık gelişmekte olup astım ve alerjik rinit bulguları tabloya eklenir. Son yıllarda yapılan çalışmalar atopik yürüyüşün ilk basamağını oluşturan atopik dermatit ve besin alerjisi arasındaki ilişkinin temel sebeplerinden birinin de epidermal bariyer disfonksiyonunun ortaya çıkmasına neden olan filagrin genindeki değişiklikler olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı filagrin genindeki değişikliklerin atopik dermatit ve besin alerjili bireylerdeki sıklıklarını Türk toplumunda ortaya koymak ve bu gendeki değişikliklerin atopik yürüyüşteki olası rolünü ortaya çıkarmaktır.

Bu amaç doğrultusunda, filagrin geninin 3. ekzon 1. tekrarında yer alan R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonları, 458 hasta ve 128 kontrol grubu bireyde PZR-RFLP yöntemi kullanılarak taranmıştır. R501X ve 2282del4 *FLG* gen bölgeleri özgün primerlerle amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrası R501X ampliconları Hin1II, 2282del4 ampliconları ise AclI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X polimorfizmi ve CAGT delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 polimorfizminin yabanıl, heterozigot ve homozigot genotipleri incelenmiş, ancak her 2 polimorfizmde de anlamlı sonuç gözlenmemiştir. R501X *FLG* mutasyon sıklığı hasta ve kontrol grubunda %0; 2282del4 *FLG* mutasyon sıklığı ise hasta grubunda %0.7, kontrol grubunda %0.8 olarak saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Atopik dermatit, atopik yürüyüş, besin alerjisi, filagrin polimorfizmleri

## **ABSTRACT**

# **ASSOCIATION OF FILAGGRIN GENE POLYMORPHISMS WITH FOOD ALLEGY AND ATOPIC DERMATITIS**

**Neşe VARDAR**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Erol AKSÖZ**

**January 2014, 57 pages**

Filaggrin (*FLG*), involved in the formation of skin barrier and be assigned in epidermal differentiation is a protein complex. Studies have shown that changes of *FLG* gene associated with allergen sensitivity and allergic diseases which are ichthyosis vulgaris, allergic rhinitis, atopic dermatitis (AD), food allergy and asthma.

Atopic diseases are related to each other in a process. Process representing natural course of atopic evidence is called as an “atopic march”. In the atopic march, first encountered atopic allergic disease is generally atopic dermatitis, and then the clinical signs of food allergy occur. Atopic dermatitis is considered to be the origin of the allergic process. Sensitivity of airway allergen is developed in the later years of life and allergic rhinitis and asthma are added to disease table. Recent studies have shown that epidermal barrier dysfunction resulted from filaggrin gene alteration might be root cause of the relation between atopic dermatitis and food allergy which are the first step of atopic march.

The aim of the study is to reveal the frequency of changes in *FLG* gene within a group of individuals with AD and food allergy in Turkish population and also to determine the role of filaggrin gene in atopic march.

For this purpose, R501X and 2282del4 *FLG* mutations which are located 3. exon's 1. repeat of *FLG* gene were screened using PCR-RFLP method in 458 patient and 128 control groups. R501X and 2282del4 *FLG* gene regions were amplified with specific primers. After the amplifications, amplicons of R501X were cut with Hin1II restriction endonuclease enzyme and amplicons of 2282del4 were cut with AdeI restriction endonuclease enzyme. Wild, heterozygote and homozygote genotypes of R501X which is a result of C/T single nucleotide polymorphism and 2282del4 which is a result of CATG deletion were investigated, but significant result weren't observed in R501X and 2282del4 *FLG* gene polymorphisms. Frequency of R501X *FLG* mutation was determined 0% in patients and control groups; frequency of 2282del4 *FLG* mutation was determined 0.7% in patient group, 0.8% in control group.

**Key words:** Atopic dermatitis, Atopic march, Food allergy, Filaggrin Polymorphisms

## TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bu yana bilgisi, tecrübesi ve sevgisiyle yanımda olan, bana her konuda yol gösteren ve hep yeni yollar açan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKSÖZ'e,

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarım için gerekli olan materyallerin elime ulaşmasında büyük bir titizlikle yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Cansın SAÇKESEN'e,

Çalışmamda DNA örneklerinin hazırlanması ve hasta bilgilerinin elime ulaştırılmasında büyük bir sabır ve emekle yardımcı olan başta Sayın Araş. Gör. Özlem BİRCAN CAVKAYTAR ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji Ünitesi değerli çalışanlarına,

Çalışmam boyunca desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e

Çalışmalarım süresince değerli bilgilerini, deneyimlerini ve desteklerini esirgemeyen, çalışmamın yapılabilmesi için tüm olanaklarını sunan ve beni sabırla dinleyen değerli hocam Dr. İ. Çağatay KARAASLAN'a

Lisans eğitimimden bu yana bilgi, tecrübe ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma,

Tez dönemimde içten desteklerinden dolayı sevgili çalışma arkadaşlarım Solmaz MOSAYYEBİ, Nazila FARHANGZAD, Araş. Gör. Tuğçe KARADUMAN ve Araş. Gör. Hayriye AKEL'e,

Beni her zaman sabırla dinleyen ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen yol arkadaşım Tarık ACAR'a

Tezimin ve hayatımın her aşamasında bana hep destek olan; evini, ekmeğini, yüreğini, sevgisini ve gülen yüzünü benimle paylaşan, akademik hayatını gururla örnek aldığım sevgili ablam Dr. Fzt. Naciye VARDAR YAĞLI'ya

Hayatımın her anında desteklerini benden hiç esirgemeyen, en zor anlarımda gülen yüzüm sevgili **babama**, sevgili **anneme**, kardeşlerim Melike VARDAR BÜYÜKBAKKAL'a ve Meltem VARDAR'a içtenlikle teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler .....	5
1.1.1 Epidermal Bariyer.....	5
1.1.1.1 Epidermal Bariyer Homeostazının Düzenleyici Mekanizmaları.....	8
1.1.1.1.1 Epidermisin Kalsiyum (Ca <sup>2+</sup> ) İyon Gradiyenti .....	8
1.1.1.1.2. Deri Yüzey Asitliği.....	8
1.1.1.1.3 Stratum Korneumun Hidrasyonu.....	9
1.1.2. Filagrin ve Epidarmal Bariyer Disfonksiyonu .....	9
1.1.2.1. Filagrin Gen ve Profilagrin Yapısı .....	9
1.1.2.2. Filagrin Sentezi.....	11
1.1.2.3. Filagrin Mutasyonları ve Epidermal Bariyer Disfonksiyonu .....	14
1.1.3 Atopik Dermatit.....	16
1.1.3.1. Atopik Dermatit Tanımı ve Sınıflandırılması.....	16
1.1.3.2. Atopik Dermatit Epidemiyolojisi .....	19
1.1.3.3. Atopik Dermatit Genetiği .....	20
1.1.3.4 Atopik Dermatit İmmünopatolojisi .....	23
1.1.4. Besin Alerjisi .....	25

1.1.4.1. Besin Alerjisi Tanımı ve Sınıflandırılması.....	25
1.1.4.2. Besin Alerjisi, Atopik Dermatit ve FLG İlişkisi.....	26
1.1.5. Atopik Yürüyüş .....	29
2. MATERYAL VE METOT .....	31
2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Kandan DNA İzolasyonu.....	31
2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	31
2.3 PZR Temelli RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Yöntemi.....	33
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
3.1. FLG R501X Mutasyonu Sonuçları.....	35
3.1.1. PZR Sonuçları .....	35
3.1.2. RFLP Sonuçları .....	35
3.2. FLG 2282del4 Delesyonu Sonuçları .....	36
3.2.1. PZR Sonuçları .....	36
3.2.2. RFLP Sonuçları .....	37
3.3. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	39
3.4. Tartışma .....	41
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1.</b> R501X hasta ve kontrol grubu değerlendirmesi.....	39
<b>Çizelge 3.2.</b> R501X hasta ve kontrol grubu mutasyon sıklığı.....	39
<b>Çizelge 3.3.</b> 2282del4 hasta ve kontrol grubu değerlendirmesi.....	40
<b>Çizelge 3.4.</b> 2282del4 hasta ve kontrol grubu mutasyon sıklığı.....	40

# ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. Kornifiye Tabakalaşmış Epitel (Epidermis).....	7
Şekil 1.2. Asidik Deri pH Oluşumunda Eksojen ve Endojen Mekanizmalar.....	8
Şekil 1.3. Epidermal bariyer.....	10
Şekil 1.4. Filagrin gen ve profilagrin protein yapısı.....	10
Şekil 1.5. Epiderminin terminal farklılaşması sırasında profilagrin süreci.....	13
Şekil 1.6. Asya ve Avrupa popülasyonlarında tanımlanan <i>FLG</i> mutasyonları.....	15
Şekil 1.7. <i>FLG</i> mutasyonlarının klinik önemi.....	16
Şekil 1.8. Atopik dermatitin klinik, histolojik ve immünokimyasal görünümü.....	18
Şekil.1.9. AD ile ilişkili immün bozukluğa yol açan genler .....	21
Şekil 1.10. AD yatkınlığını arttıran genlerin tanımlanmasında genetik epidemiyolojik yaklaşımlar.....	22
Şekil 1.11. Atopik dermatitin farklı evrelerinde immünolojik yollar.....	24
Şekil. 1.12. Besin alerjisinde görev alan T yardımcı hücrelerinin 2 tipinin reaksiyon sistemleri.....	26
Şekil 1.13. (A) AD 'de kutanöz inflamasyonda alerjenlerin etkisi.(B) Besin alerjisinin patogeneğinde çift-alerjen maruz kalma hipotezi.....	28
Şekil 1.14. Filagrin haplo yetmezliği (haploinsufficiency) ve kompleks hastalıkların artma riski.....	30
Şekil 2.1. PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere dizayn edilen primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	32
Şekil 3.1. <i>FLG</i> geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren 247 bç'lik bölgenin PZR sonrası agaroz jelde	

görüntülenmesi.....	35
<b>Şekil 3.2.</b> <i>FLG</i> geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren bölgenin Hin1II enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	36
<b>Şekil 3.3.</b> <i>FLG</i> geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren 811 bç'lik bölgenin PZR sonrası agaroz jelde görüntülenmesi.....	37
<b>Şekil 3.4.</b> <i>FLG</i> geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren bölgenin AdeI enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	38

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

>	Büyük
~	Yaklaşık
°C	Santigrat derece
γ	Gamma (Gama)
β	Beta
ε	Epsilon

### Kısaltmalar

A	Adenin
AD	Atopik dermatit
bç	Baz çifti
BH	Bleomycin hidrolaze (Bileomisin hidrolaz)
C	Sitozin
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CAP1/Prss8	Prostasin (proteaz)
CD14	CD 14 molekülü
CE	Cornified Envelope (Kornifiye zarf)
CLDN1	Klaudin 1
CMA1	Kimaz 1,mast hücre
CRH	Kortikotropin salgılatıcı hormon
DCs	Dendritic cells (Dendritik hücreler)
DEFB1	Defensin beta 1
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDC	Epidermal Differentiation Complex (Epidermal farklılaşma kompleksi)
EH	Eczama hepeticum
FcεRI	High-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI)
FLG	Filagrin
G	Guanin

GSTP1	Glutatyon S- tranferaz
IDECs	İnflamatuvar dendritik epidermal hücreler
IFN $\gamma$	İnterferon gama
IgE	İmmünoglobülin E
IL-10	İnterlökin 10
IL-13	İnterlökin 13
IL-17	İnterlökin 17
IL18	İnterlökin 18
IL-22	İnterlökin 22
IL-25	İnterlökin 25
IL-31	İnterlökin 31
IL-33	İnterlökin 33
IL-4	İnterlökin 4
IL4RA	İnterlökin 4 reseptör A
IRF 2	İnterferon regülatör faktör 2
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KLK 5	Kallikrein 5 (proteaz)
LCs	Langerhans cells (Langerhans hücreleri)
LEKTI	Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor (Limfo-epitelial kazal tip tripsin inhibitörü)
LOR	Lorikrin
MAS	Çok merkezli allerji çalışma kohortu
mM	Milimolar
MT/SP1	Serin proteaz matriptaz (proteaz)
NIAID	National Institutes of Allergy and Infectious Disease
NMFs	Natural Moisturizing Factors (Doğal nemlendirici faktörler)
NOD1	Nükleotid-bağlayan oligomerizasyon domain 1
PADs	Peptidil arginine deiminases (Peptidil arjinin deaminazlar)
PCA	Pirolidon karboksilik asit
pmol	Pikomol

PP2A	Protein phosphatase 2A (Protein fosfataz 2A)
PPase	Protein phosphatase (Protein fosfataz)
PZR (PCR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RANTES (CCL5)	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Kimokin C-C motif ligand 5)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SC	Stratum corneum (Stratum korneum)
SCORAD	Score of atopic dermatitis
SG	Stratum granulosum (Stratum granülozum)
sIgE	Spesifik IgE
SPINK5	Serine Protease Inhibitor, Kazal Type 5 (Serin proteaz inhibitörü Kazal tip-5)
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGMs	Transglutaminases (Transglütaminazlar)
Th 17	T yardımcı hücre 17
Th1	T yardımcı hücre 1
Th2	T yardımcı hücre 2
Th22	T yardımcı hücre 22
TIM1	T-hücre membran protein 1
TJs	Tight junctions (sıkı bağlantılar)
TLR2	Toll-benzeri reseptör 2
TSLP	Timik stromal lenfopoietin
U	Ünite
UCA	Ürokanik asit
UTR	Untranslated Region (Translasyona Uğramayan Bölge)
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre



# 1. GİRİŞ

Alerji, antijen-antikor reaksiyonunun oluşturduğu öncü bir duyarlılaşmanın ardından vücut savunma sisteminin reaksiyona hazır hale gelmesi nedeniyle organizmanın aşırı hassaslaşması olarak tanımlanmaktadır. İlk defa 1906 yılında Clemens von Pirquet tarafından ortaya atılan alerji terimi genel olarak “farklılaşmış vücut cevabı” anlamına gelmektedir.[1] 1923’de Coca ve Cooke, kalıtsal bir eğilimi olan aşırı duyarlılık reaksiyonlarını tanımlamak için ‘atopi’ terimini kullanmıştır [2]. Bugün ise elde ettiğimiz veriler ışığında atopi terimi; solunum, sindirim veya temas yoluyla alınan bazı yabancı antijenlere karşı B lenfositlerin artmış IgE antikor yapması ile karakterize, astım, alerjik rinit ve atopik dermatit gibi alerjik hastalıklardan birine veya birden fazlasına yol açma ihtimali olan kalıtsal bir eğilim olarak tanımlanmaktadır. Alerji terimi ise, IgE aracılığı ile oluşan klinik durum olarak ifade edilmektedir [3,4].

Son yıllarda dünyanın pek çok ülkesinde astım ve diğer alerjik hastalıklar artış göstermektedir. Yapılan çalışmalarla astımın global prevalansı %1-18, alerjik rinitin %10-20, atopik dermatitin çocuklarda %15-30, erişkinlerde %1-3 ve besin alerjisinin çocuklarda %6, erişkinlerde %3-4 olduğu gösterilmiştir [5,6].

Son yıllarda araştırmacılar atopik hastalıklar olarak adlandırılan atopik dermatit, astım, alerjik rinit ve besin alerjisinin nedeni olarak filagrin geniyle ilişkili epidermal bariyer disfonksiyonu üzerinde durmaktadırlar [6].

Epidermal bariyer, yoğun su kaybını ve deri içine iritanlar, alerjenler ve mikroorganizmaların geçişini engellemektedir [7]. Deri bariyerinin bu koruyucu fonksiyonu; stratum korneum (SC), sıkı bağlantılar (TJ) ve immünolojik bariyer (dendritik hücreler (DCs)) ile sağlanmaktadır [6].

Keratinositlerin terminal farklılaşması sonucu sırasıyla; bazal hücre tabakası, spinous hücre tabakası, granüler hücre tabakası ve son olarak da kornifikasyon ya da keratinizasyon olarak isimlendirilen keratinositlerin farklılaşmasıyla da epidermin en üst tabakası olan korneum tabakası (SC) oluşur [8,9]. SC; hücreler arası lipit tabakaları, kornifiye zarf (CE), keratin filament ağı ve keratohiyalin granülleri olmak üzere 3 temel özellik göstermektedir [10].

Kornifiye tabakanın oluşması, bir grup majör protein sentezini içerir. Kornifikasyonda rol alan anahtar proteinler 1q21 kromozomunun gen-yoğun bölgesinde kodlanır. Bu bölgeye epidermal farklılaşma kompleksi (EDC) denir. EDC bölgesi 1.62 megabaz büyüklüğünde olup 70 gen ifade eder. Bu genlerden biri de SC'deki hücrelerde meydana gelen farklılaşmada anahtar rol oynayan, filagrin proteinini kodlayan filagrin (*FLG*) genidir [11].

*FLG*, EDC bölgesindeki *FLG* geni adı verilen gen bölgesinden >400kDa büyüklüğünde öncül protein olan profilagrin şeklinde ifade edilir [6,12]. Aktif olmayan büyük profilagrin öncülleri geniş, kompleks, yüksek oranda fosforlanmıştır ve epidermin granüler hücre tabakasında keratohyalin granüllerinin ana bileşeni olarak bulunurlar [9]. Kornifiye hücre zarfının (CE) oluşumu boyunca profilagrin defosforile edilir ve *kanal aktive edici serin proteaz/Prss* ve *matriptaz/matriptaz* gibi serin proteazlar tarafından proteolizize uğratarak çok sayıda fonksiyonel filagrin kopyaları oluşturulur [13]. Serbest kalan filagrin monomerleri doğrudan keratin filamentlerine bağlanır ve keratinosit hücreiskeletinin oluşmasını sağlar. Hücreiskeletin oluşmasını *transglütaminazlarla (TGMs)* çapraz bağlanma ve *peptidil arjinin deaminazlar (PADs)* 'la çözünmez keratin matriks oluşturulması takip eder. Lipitler ve diğer kornifiye tabaka proteinlerinin oluşturduğu bu son forma deri bariyeri denir. Sonrasında filagrin çeşitli proteazlar tarafından degradasyona uğrar ve serbest amino asitler ve türevlerinin oluşmasını sağlar. Bunların tamamı doğal nemlendirici faktörler (NMFs) olarak isimlendirilirler ve deri hidrasyonu, pH'ın ayarlanması ve (muhtemelen) UV korunmasına katkıda bulunurlar [14].

Epidermal bariyer fonksiyonunda *FLG*'nin kritik rolü, yaygın dermatolojik ve alerjik hastalıklarda bu genin patojenik öneminin temelini oluşturur [15]. Deri bariyerinin bütünlüğüne profilagrinin esas önemi 2006 'da İktiyosis vulgaris'li hastalarda fonksiyon kaybedici mutasyonlar olan (loss-of-function mutations) R501X ve 2282del4 mutasyonlarının keşfiyle farkedilmiştir [16,17]. Yapılan çalışmalar *FLG* mutasyonlarının topluma özgü olduğunu göstermiş ve bugüne kadar Asya ve Avrupa populasyonlarına özgü 49 kesilme mutasyonu (truncating mutation) tanımlanmıştır [15]. *FLG* mutasyonlarının atopik dermatit ve diğer atopik hastalıklar için majör bir risk faktörü olduğu bilinmektedir [16].

Atopik dermatit (AD); bebeklik ve erken çocukluk döneminde yaygın olarak görülen, kaşıntılı ve iltihaplı deri ile karakterize kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır [18]. AD'nin klinik fenotipi; yatkınlık genleri, konağın çevresi, enfeksiyöz ajanlar, epidermal

bariyer disfonksiyonu ve sistemik ve lokal immünolojik cevap arasındaki kompleks etkileşimler ile karakterizedir [19].

AD, alerjen-özgün IgE antikorlarının varlığı ya da yokluğuna göre intrinsik ve ekstrinsik AD olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır [20]. Ancak intrinsik tipin AD 'nin ayrı bir formu olduğuna dair araştırmacılar arasında fikir birliği bulunmamaktadır ve bazı araştırmacılar intrinsik tipi, atopiform dermatit ya da pseudo-atopik dermatit olarak adlandırmaktadır. AD'li hastaların %20'sinde gözlenen intrinsik tip; değişmeyen total serum IgE değeri, protein olmayan alerjenlere duyarlanma, ilerleyişinde diğer atopik hastalıkların gözlenmemesi, normal epidermal bariyer, *FLG* mutasyonlarının bulunmaması ve düşük Th2-yüksek Th1 immün cevabıyla karakterizedir. AD'li hastaların %80'inde gözlenen ekstrinsik tip ise; yüksek total serum IgE değeri, protein alerjenlere duyarlanma, hastalık seyrinde diğer atopik hastalıkların da tabloya katılması, epidermal bariyer disfonksiyonu, *FLG* mutasyonları ve yüksek Th2 immün cevabıyla karakterizedir. İntrinsik AD'nin nedenleri ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna rağmen ekstrinsik AD'den normal epidermal bariyer fonksiyonu ve IFN  $\gamma$  üretim potansiyeliyle ayırt edilebilmektedir [21].

AD'nin deri inflamatuvar cevabı; T lenfositler, dendritik hücreler (DCs), makrofajlar, keratinositler, mast hücreleri ve eozinofillerin aktivasyonu ile karakterizedir [18]. AD genellikle en çok IgE aracılı mekanizmalar ile ilişkilidir ve hastaların büyük çoğunluğunda yüksek IgE seviyeleri gözlenir. AD Th1/Th2 paradigması içinde Th2 immün cevap ile karakterize edilmesine rağmen, çalışmalar AD'nin immünolojisinden bifazik immün cevabın sorumlu olabileceğini göstermiştir. AD'nin akut fazında Th2 immün cevap baskınken, kronik faza geçildiğinde daha çok Th1 immün cevap baskın olarak gözlenmektedir [22]. AD patogenezi hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir, ancak epidermal bariyer disfonksiyonuyla artan alerjen maruziyeti sonucu T hücrelerin duyarlanmasıyla oluşan immün cevabın AD patogenezinin temelini oluşturduğu bilinmektedir [23].

AD'li hastalarda epidermal bariyer disfonksiyonu ve immün cevap yetersizliği gibi çeşitli faktörler sebebiyle; *S. aureus* başta olmak üzere bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlar yaygın olarak görülmektedir [11]. AD ile birlikte seyreden *S. aureus* enfeksiyonlarının deri

bariyerindeki hasarı daha da arttırarak alerjik duyarlanma ve inflamasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir [24].

Yapılan farklı gen linkaj çalışmalarında çeşitli kromozom bölgeleri AD ile ilişkili bulunmuştur [22]. AD ile ilgili yapılan çalışmalarda uzun süre immünolojik hasara neden olan genler üzerinde durulmuş, ancak sonrasında önemli bir epidermal yapısal proteini kodlayan *FLG* genindeki mutasyonların keşfiyle, epidermal bariyer hasarları AD patolojik modellerinin merkezi olmuştur [25,26].

*FLG* mutasyonlarının besin alerjilerine kutanöz maruziyette, derinin proteinlere geçirgenliğini arttırarak alerjik duyarlılık riskini arttırmada anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir [27]. Hastalığı ağır-orta AD şeklinde ilerleyen yaklaşık her 3 çocuktan 1'inde besin alerjisi bulunduğu gösterilmiştir [28]. Besin alerjisi; IgE aracılı, IgE aracılı olmayan ve ikisinin karışımı olan karışık tip olarak sınıflandırılmaktadır [29]. AD'nin seyrinde, hem IgE aracılı hem de IgE aracılı olmayan reaksiyonların görüldüğü karışık tip besin alerjisi eşlik etmektedir [30]. Ancak AD ve besin alerjisi arasındaki ilişki, immünolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamadığı için karmaşık bir konu olarak kabul edilmektedir [31].

Farklı toplumlarda yapılan genetik çalışmalar; *FLG* mutasyonları sebebiyle ortaya çıkan epidermal bariyer disfonksiyonunun, atopik dermatit, alerjen duyarlanma ve AD ile ilişkili astım gelişimini arttırdığını göstermektedir [32]. Genel olarak bebeklik döneminde alerjik hastalıklardan ilk karşılaşılan AD'dir. Sonrasında tipik olarak AD'yi besin alerjisi izler. Çocukluk döneminde ise bu hastalık tablosuna astım ve alerjik rinit de katılır. Bu atopik belirtilerin AD'den alerjik rinit ve astıma doğru ilerleyişi atopik yürüyüş olarak tanımlanmaktadır [5,33].

Besin alerjisi ile AD atopik hastalık sürecinde genellikle birlikte görüldüğü için, IgE-aracılı besin alerjisi bulunan çocuklarda alerjik rinit ve astım geliştirme riskine tek başına olan etkisi bilinmemektedir [34]. Astım ve AD arasındaki ilişki atopik yürüyüşte farklı ve henüz aydınlatılamamış mekanizmaların bulunması sebebiyle tam olarak açıklanamamaktadır. Ancak astım ve AD 'nin yüksek IgE seviyeleri, Th2 sitokinleri, lezyonal ve periferik eozinofiller ve çevresel tetikleyicileri gibi ortak immünolojik özellikleri içerdiği bilinmektedir [35]. Yapılan çalışmalar; ağır AD'si bulunan hastaların %70'inde, orta AD'si

bulunan hastaların %30'unda ve genel populasyonun yaklaşık %8'inde astım geliştiğini göstermektedir [36]. Astımın atopik yürüyüş içerisinde ikincil bir duyarlanma olduğu düşünülmektedir. Sadece epidermal bariyer disfonksiyonu sonrasında *FLG* mutasyonlarıyla ilişkili AD'si bulunan hastalarda astım gelişiminin gözlenmesi bu düşüncüyü doğrulamaktadır. Ancak *FLG* mutasyonlarının astım ve alerjik rinite olan etkisi alerjik hastalıklardaki mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması sebebiyle bilinmemektedir [35].

Yapmayı planladığımız çalışmada; *FLG* geninde yaygın olarak görülen ekzon 3 bölgesindeki tekrar 1'de yer alan, C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X ve ekzon 3 tekrar 1'de yer alan, /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 boş (null) mutasyonlarının besin alerjisi ve atopik dermatitle olan ilişkisini kendi toplumumuzda ortaya koymayı amaçlamaktayız. Çalışmamızın diğer önemli bir amacı; atopik dermatitli bireylerin bir grubunda ilerleyen dönemde gözlenen besin alerjisi ile filagrin genindeki R501X ve 2282del4 fonksiyonel polimorfizmlerinin ilişkisini değerlendirmek ve atopik yürüyüşteki rolünü belirlemektir.

## **1.1 Genel Bilgiler**

### **1.1.1 Epidermal Bariyer**

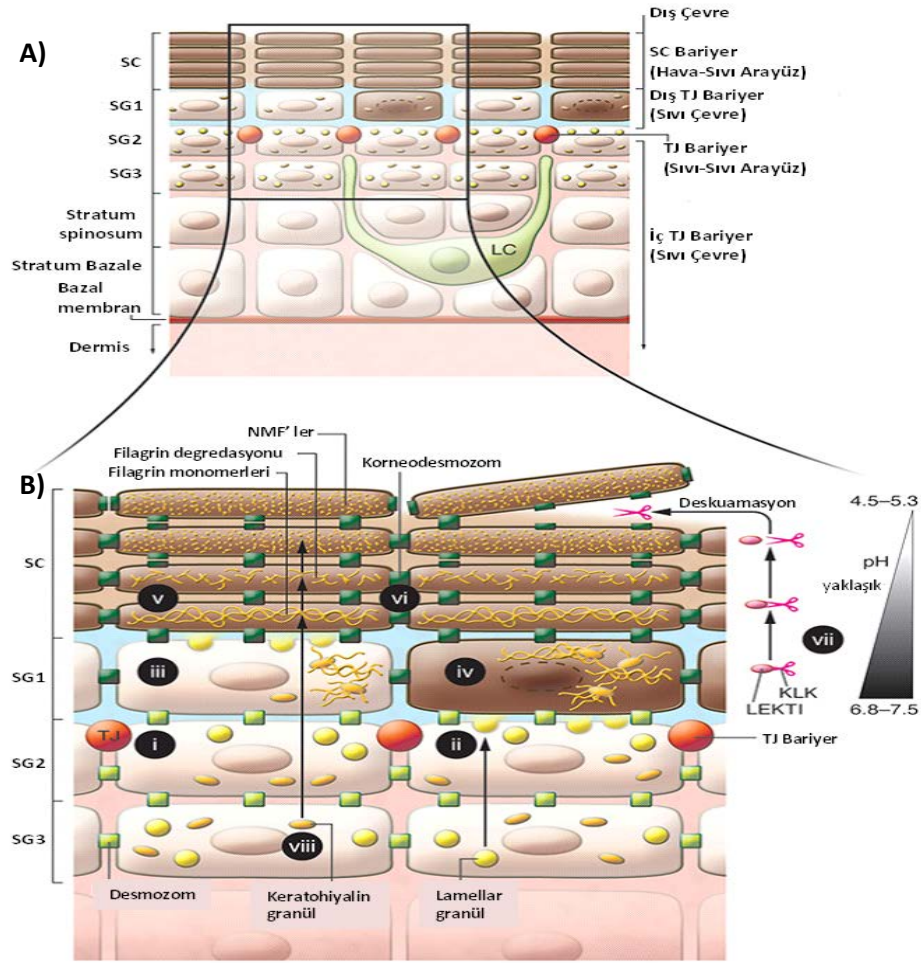
Epidermis; kompleks, son derece dinamik, kendini yenileyen ve vücudun çok büyük bir kısmını kapsayan bariyer dokudur [15]. Fiziksel (mekanik travma, termal yaralanma, radyasyon), kimyasal (yakıcı maddeler, yüzey aktif maddeler, ksenobiyotikler, alerjenler) ve biyolojik (bakteri, virüs, vb.) çevresel faktörlerden vücudun korunmasını sağlar. Organizmadan çevreye kontrolsüz su, iyon ve serum proteinlerinin geçişini önleyerek homeostazı muhafaza eder [37,38].

Epidermis proliferasyon yeteneğine sahip hücrelerin (keratinositler) bulunduğu stratum bazale ve birkaç yüzeysel tabakadan oluşan stratum spinozum, stratum granülozum (SG) ve son olarak stratum korneum (SC) tabakalarından oluşur [6] [Şekil1.1]. Hücre proliferasyonu sadece bazal tabakadaki hücrelerde görülür. Diğer tabakaları oluşturan hücreler, bazal tabakadaki yeni oluşan hücrelerin göçüyle meydana gelir. Spinozum tabakasındaki hücreler SG tabakasında farklılaşıp yassılaşıp, lamellar ve keratohiyalin granüllerini oluşturmaya başlarlar. Granülozum tabakası, epidermis kütlelerinin % 80-90'ını oluşturan ana protein bileşenleri keratin ve filagrin içerir. Lamellar granüller; yağlar,

ekstraselüler yapısal proteinler, hidrolitik enzimler ve katelisin ve  $\beta$ -defensin gibi antibakteriyal peptitlerden oluşmaktadır. Granüler hücrelerde sıkı bağlantı (TJ) ve desmozom hücreler arası bağlantıları bulunmaktadır. SG'de yer alan Langerhans hücreleri, epidermiste immün bariyer olarak görev almaktadır [6,15,39].

SG'nin en üst katmanına doğru gidildikçe sıkı bağlantılar (TJ) kaybolur ve kornifiye tabaka oluşana kadar devam eden kornifikasyon başlar [6,8]. Kornifikasyona uğrayan keratinositler DNA içeriklerini ve çekirdek yapılarını kaybederek korneosit adını alırlar [39]. Seramid, kolestrol, serbest yağ asitleri gibi interselüler lipidler ve proteinleri içeren, esnek ve geçirgen olmayan, kornifiye zarf (CE) adı verilen membranları bulunan sıkıca paketlenmiş korneositler; korneodesmozomlarla birbirlerine bağlanarak SC tabakasını oluştururlar. [8,39,40]

Keratinositlerin korneositlere farklılaşması epidermal bariyer fonksiyonunun korunmasında kritik rol oynar. Kornifiye tabakanın oluşması, bir grup majör protein sentezini içerir. Bu proteinler transglutaminazlarla birbirine çapraz bağlarla bağlanarak ekstraselüler ortama kovalent olarak bağlanan lipid bir zar oluştururlar. Kornifikasyonda rol alan anahtar proteinler 1q21 kromozomunun gen-yoğun bölgesinde kodlanır. Bu bölgeye epidermal farklılaşma kompleksi (EDC) denir. EDC bölgesi 1.62 megabaz büyüklüğünde olup 70 gen ifade eder. Bu genlerden biri de SC'deki hücrelerde meydana gelen farklılaşmada anahtar rol oynayan, filagrin proteini kodlayan filagrin genidir (*FLG*) [11].



**Şekil 1.1.** Kornifiye Tabakalaşmış Epitel (Epidermis)

A) SC bir hava-sıvı arayüz bariyer olarak davranır ve canlı katmanları kurumaya karşı korur. TJ 'ler de SG2 hücreleri arasındaki paraselüler boşluğu kapatır. LC 'ler antijenleri algılayabilmek üzere konumlanmıştır.

B) SG3 hücrelerinin farklılaşmasıyla SG2 hücreleri oluşur. SG2 hücrelerinin arasında TJ 'ler (i) vardır ve apikal membranlarından lamellar granülleri salgılamaya başlarlar (ii). SG1 hücreleri arasında TJ 'ler kaybolur (iii) ve son kornifikasyon gerçekleşir (iv). Olgun korneositler kornifiye zarf (CE) ile çevrelenir (koyu kahverengi v) ve hücreler arası alan lipid lamellerle doldurulur (kahverengi). Korneodesmozomlar (yeşil kare vi) korneositler arasında adhezyona aracılık ederler. SC'nin üst tabakalarının asidik hale gelmesiyle LEKTI tarafından kallikrein ilişkili peptidazlar (KLKs) salınır ve korneodesmozomların proteoliziyle deskuamasyon başlar (vii). SG'de keratohyalin granüllerinin bir bileşeni olan profilagrin, filagrin monomerlerine degrade olur. SC'nin üst katmanlarında ise bu filagrin monomerleri doğal nemlendirici faktörlere (NMFs) degrade olurlar [6].

### 1.1.1.1 Epidermal Bariyer Homeostazının Düzenleyici Mekanizmaları

Çevresel faktörlerden (fiziksel, kimyasal, biyolojik) koruma ve su dengesinin düzenlemesi gibi çeşitli koruyucu fonksiyonları bulunan epidermal bariyerin oluşumu ve devamlılığı için birbiriyle ilişkili mekanizmalar ve sinyal sistemleri bulunmaktadır [41].

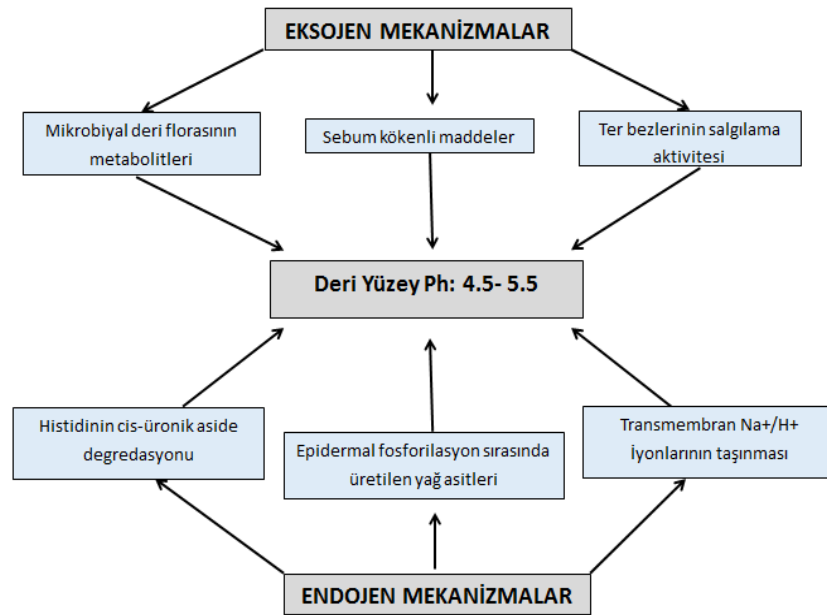
#### 1.1.1.1.1 Epidermiste Kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) İyon Gradiyenti

Epidermiste  $Ca^{2+}$  iyonlarının kantitatif dağılımı homojen değildir. Bazale ve spinous tabakalarında  $Ca^{2+}$  seviyesi düşükken, SG tabasında  $Ca^{2+}$  iyonu seviyesi pik yapmaktadır [42]. Deneysel olarak hasara uğratılmış epidermal bariyerde düşük  $Ca^{2+}$  seviyesi oluşumu görülmüştür. Düşük  $Ca^{2+}$  seviyesinin sitokinler ve epidermal bariyer hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [43,44].

$Ca^{2+}$ , epidermiste hücrelerarası haberleşmenin sağlanması ve hücre farklılaşmasında gereklidir.  $Ca^{2+}$  yokluğunda kadherinler aracılığıyla sağlanan hücrelerarası haberleşme zorlaşmaktadır [45].

#### 1.1.1.1.2. Deri Yüzey Asitliği

Asidik pH, epidermal bariyerin oluşumu, bütünlüğünün korunması ve koruyucu fonksiyonu için önemlidir [46]. Deri pH oluşumu için eksojen ve endojen mekanizmalar şekilde gösterilmiştir [47,48] [Şekil 1.2.].



Şekil 1.2. Asidik Deri pH Oluşumunda Eksojen ve Endojen Mekanizmalar [47].



Epidermal bariyerin bozulmasıyla değişen pH sonucu *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* gibi bakteri ve mantar kaynaklı enfeksiyonların gelişimi görülmektedir [6].

### **1.1.1.1.3 Stratum Korneumun Hidrasyonu**

Epidermiste su dağılımı homojen değildir. SC'nin üst katmanlarından aşağılara doğru gidildikçe su oranı %15'ten %20'lere çıkmakta, SC ile SG arasındaki sınır noktasında ise %40'lara ulaşmaktadır. Epidermisin daha alt tabakalarına gidildiğinde ise su oranındaki bu kademeli artış %70'leri bulmaktadır [47,48].

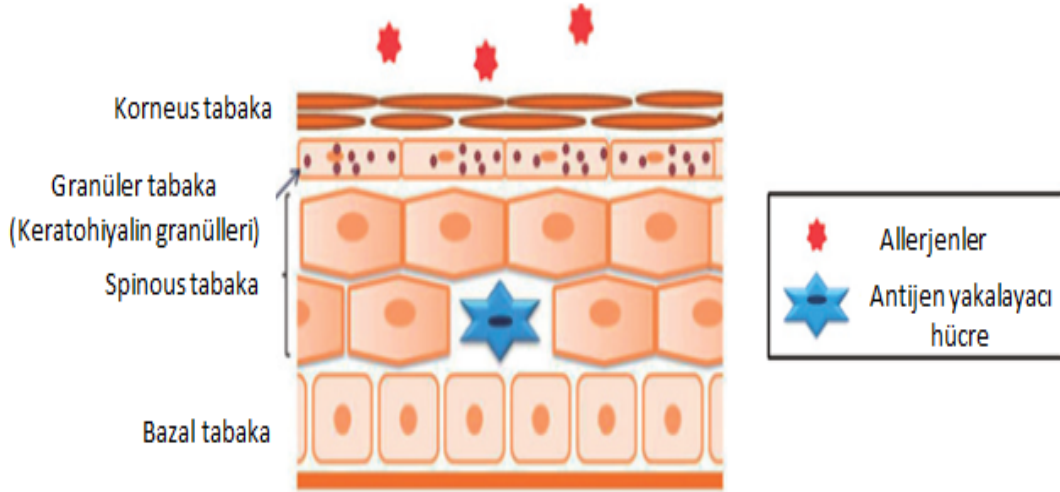
Birçok fizyolojik süreç SC'nin hidrasyonuna bağlıdır. Deskuamasyonda korneodesmozomların enzimler (glikosidaz ve serin proteaz) tarafından degradasyona uğratılması için su gereklidir, gerekli olan bu su SC'den sağlanmaktadır [49].

SC tabakadaki hücrelerde meydana gelen farklılaşmada anahtar rol oynayan filagrinin enzimatik degradasyonu da suya bağımlıdır. SC'nin hidrasyonu azaldığında filagrin; suyun SC'de alıkonmasını sağlayan, NMF'lerin bileşeni olan higroskopik amino asitlere degrade olur; böylece epidermal bariyerde su dengesi sağlanmış olur [40,50].

## **1.1.2. Filagrin ve Epidermal Bariyer Disfonksiyonu**

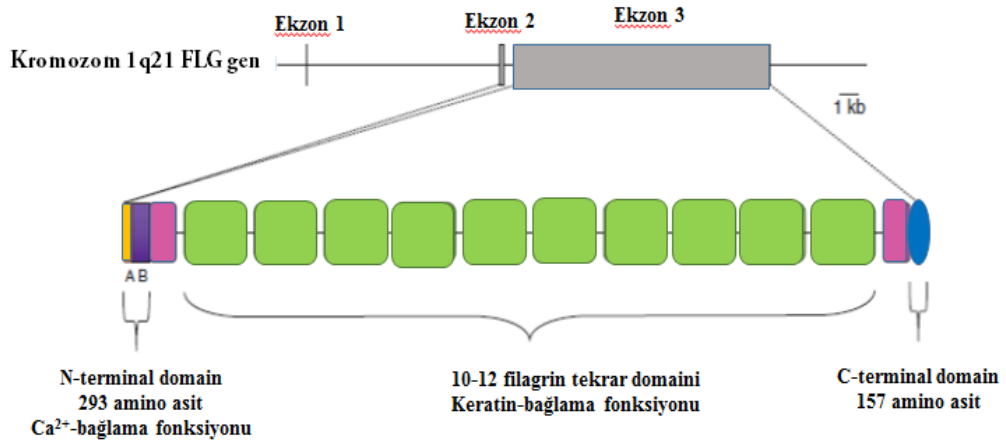
### **1.1.2.1. Filagrin Gen ve Profilagrin Yapısı**

Filagrin (filament-agregasyon protein) terimi ilk kez SC'den izole edilen yapısal proteinlerin bir sınıfını tanımlamak için 1981'de kullanılmıştır [51]. Büyük inaktif profilagrin öncülleri; geniş, kompleks, yüksek oranda fosforizedir ve epidermisin granüler hücre tabakasında, keratohyalin granüllerinin temel bileşeni olarak yer alırlar [9] [Şekil 1.3.].



**Şekil 1.3.** Epidermal bariyer. Granüler tabakada keratohiyalin granüllerinde profilagrin yoğun olarak bulunur. Keratinositlerin farklılaşmasıyla degradasyon ürünü olan filagrin, keratin filamentlerini toplar ve keratinositleri yassılaştırarak dış alerjenlere karşı etkili bir bariyer oluşturur [9].

Kromozom 1q21'de EDC bölgesinde bulunan *FLG* geni (~25 kb) 3 ekzon ve 2 intron içerir. Ekzon 1'de (15 bç) yalnızca 5' translyasyon olmamış (UTR) dizi, ekzon 2'de (159bç) translyasyon başlatma kodonu bulunur. Ekzon 3'te ise, N- terminal domaini (A ve B domainini içerir), 2 tane translyasyon olmayan filagrin tekrar domain, 10-12 birbirine komşu *FLG* tekrar domain ve C-terminal domain bulunur. Bazı bireylerde *FLG* tekrarlarının 8. ve /veya 10. tekrarlarında dublikasyon görülür [9,14] [Şekil 1.4].



**Şekil 1.4.** Filagrin gen ve profilagrin protein yapısı [14].

N-terminal domaini, A ve B olmak üzere 2 alt domaine ayrılır. A domaininde, S100 protein ailesinin EF-elleriyle benzerliği olan 2 tane  $Ca^{+2}$  bağlanma motifi bulunur. Bu motiflerin varlığı ( $Ca^{+2}$  profilagrine bu motiflerden bağlanır), epidermisin terminal farklılaşması sırasında yürütülen profilagrin sürecinde  $Ca^{+2}$ 'nin anahtar regülatör olduğunu gösterir. Profilagrinin filagrin monomerlerine dönüşüm sürecinde A ve B domainleri profilagrinden ayrılır. B domaini nükleer lokalizasyon sinyali içerir ve keratinositlerin terminal farklılaşmasında N-terminal domaininin çekirdeğe translokasyonunu kolaylaştırır. Profilagrinin N-terminal domainin, granüler hücrelerin çekirdeklerini kaybederek çekirdeksiz kornifiye hücrelere dönüşümü sırasında rol oynadığı ileri sürülmektedir [14,52].

C-terminal domaininin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, ancak ekspresyonunun profilagrinden filagrine dönüş sürecinde gerekli olduğu görülmektedir. Çünkü kesilme mutasyonuna (truncating mutation) sahip bireylerde 10-12 *FLG* tekrarlarının ekspresyonu görülürken filagrin monomerlerinin oluşum süreci gerçekleşmez [14,53].

Profilagrin sentezinden sonra yoğun bir şekilde fosforilasyona uğrar. Bu sürecin keratin filamentleriyle erken ilişkisini engellemek için gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Çünkü sadece defosforile filagrin monomerler keratin-filament-agregasyonu özelliklerine sahiptir. Ayrıca fosforile profilagrin son derece çözünmez bir yapıda olduğundan keratohiyalin granüllerine paketlenmesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir [14,54].

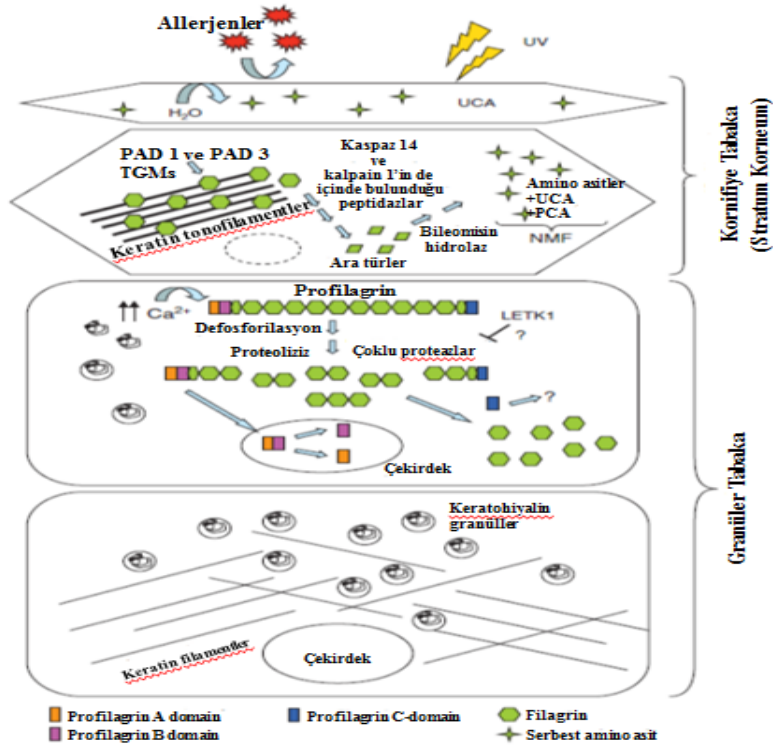
#### **1.1.2.2. Filagrin Sentezi**

Granüler hücrelerin kornifiye hücrelere değişimi sırasında profilagrinin çok sayıda monomerik kopyaya proteolitik dönüşümü, sıkı bir şekilde kontrol edilen çok basamaklı bir süreci içerir. Bu süreç defosforilasyon ve proteoliziz ile başlar.

Profilagrin defosforilasyonunda *asit fosfataz* ve *PP2A-tip* enzimlerinde bulunduğu birçok protein fosfataz (PPase) gösterilmiştir [55]. Proteolizizde ise *serin proteaz matriptaz (MT/SP1)*, *prostasin (CAP1/Prss8)*, *kallikrein 5 (KLK 5)* gibi proteazlar filagrin monomerlerinin oluşumunu sağlarlar. Proteaz aktivitesinin kontrolü bir seri inhibitörle sağlanır. Bu inhibitörlerden en iyi karakterize edilmiş olan *SPINK5* geni tarafından kodlanan *limfo-epitelial kazal tip tripsin inhibitörüdür (LEKTI)* [56]. *LEKTI*'nin *KLK 5*'in

inhibisyonunda anahtar rol oynadığı bilinmesine rağmen, *matriptaz* ve *prostasin* üzerine olan etkisi henüz biyokimyasal olarak açıklanamamıştır [14].

Defosforilasyon ve proteoliziz sonucunda fonksiyonel çok sayıda 10-12 tane ayrı 37- kDa filagrin kopyaları oluşur. Bu etkin kopyalar keratinositlerin içindeki ipliksi hücreiskeleti destekler, ölü hücreleri kompakt bir katman olarak yassılaştırır ve *transglutaminazlar* (*TGMs*) tarafından kimyasal olarak çapraz bağlanırlar [57]. Bağlanma sonrası *peptidil arjinin deaminazlar* (*PADs*)'lar tarafından (*PADs*'ların izoformu olan *PADI* ve *PAD3*'ün filagrin deiminasyonunda görev aldığı düşünülüyor) modifiye edilir [14,58]. Modifiye edilmiş filagrin monomerlerinden stratum korneumda filagrin translasyon sonrası modifikasyon enzimleri olan; *kaspaz 14*, *kalpain 1* ve *bileomisin hidrolaz* (*BH*) ile serbest amino asitler ve türevlerinden (ürokanik asit (UCA), piroolidon karboksilik asit (PCA) gibi) oluşan bir aminoasit havuzu oluşur. Buna doğal nemlendirici faktör (NMF) denir. NMF son derece higroskobiktir ve stratum korneumun hidrasyonunda anahtar rol oynar. NMF ayrıca korneum tabakanın su kaybeymesini önler ve esnekliğini sağlar [53,56,59]. NMF'nin yapısında bulunan amino asit türevlerinin pH'ın korunmasında, ve UV'den korunmada etkili olduğu düşünülmektedir [14,53]. NMF aynı zamanda bariyer geçirgenliğini korur ve epidermisin antimikrobiyal aktivitesinde görev alır [57]. Epidermisin terminal farklılaşması sırasında profilagrin süreci şekilde gösterilmiştir [Şekil 1.5.] [14].



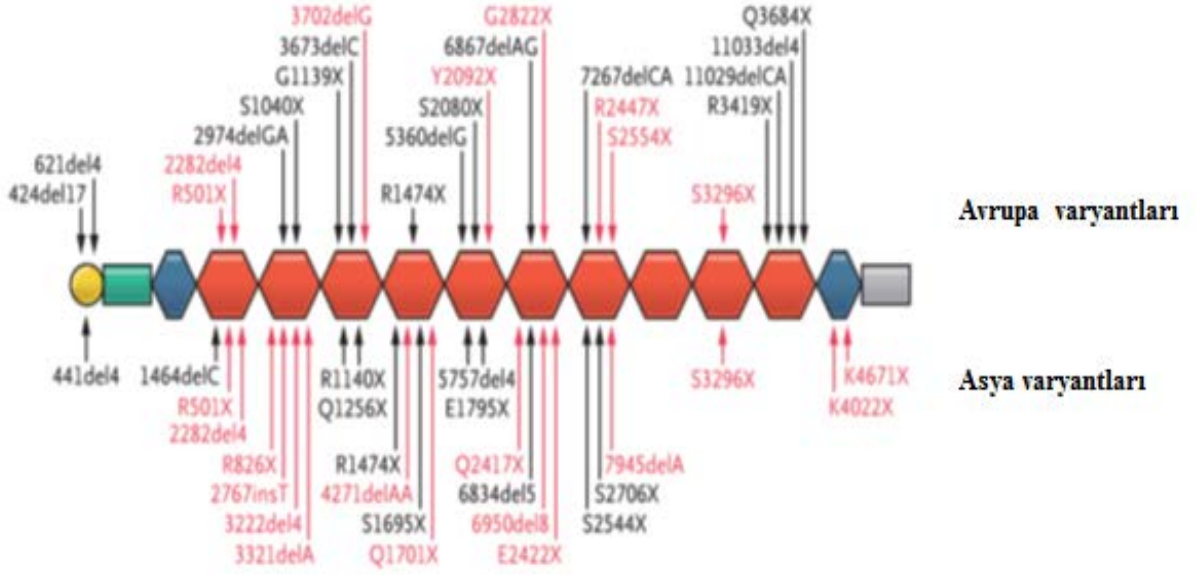
**Şekil 1.5.** Epidermin terminal farklılaşması sırasında profilaggrin süreci. Granüler tabakada profilaggrin, keratohyalin granülleri içerisinde inaktif ve çözünmez bir formda saklanır.  $Ca^{+2}$  seviyesindeki artışa cevap olarak keratohyalinler degranüle olur ve profilaggrin defosforilasyon ve proteolizisi içeren çok basamaklı bir süreçten geçerek filaggrin monomerlerine dönüşür. Bu basamaklarda fosfatazlar (*asit fosfataz* ve *PP2A-tip* enzim gibi) ve proteazlar (*proteaz matriptaz (MT/SPI)*, *prostasin (CAP1/Prss8)*, *kallikrein 5 (KLK 5)* gibi) görev alır. Filaggrin monomerlerinin ayrılmasını takiben N-terminal domaini nükleer translokasyona uğrar ve A ve B domainine degrade olur. Kornifiye tabakada serbest kalan filaggrin monomerleri doğrudan keratin filamentlerine bağlanır ve keratinosit hücreiskeletinin oluşmasını sağlar. Hücreiskeletin oluşmasını *transglütaminazlarla (TGMs)* çapraz bağlanma ve *peptidil arjinin deiminazlar (PADs)*’larla çözünmez keratin matriks oluşturulması takip eder. Lipitler ve diğer kornifiye tabaka proteinlerinin oluşturduğu bu son forma deri bariyeri denir. Deri bariyeri su kaybını ve alerjenler gibi istenmeyen moleküllerin girişini engeller. Sonrasında filaggrin çeşitli proteazlar (*kaspaz 14*) tarafından degradasyona uğrar ve serbest amino asitler ve türevlerinin (ürokanik asit (UCA), pirolidon karboksilik asit (PCA) gibi) oluşmasını sağlar. Bunların tamamı doğal nemlendirici faktör (NMFs) olarak isimlendirilirler ve deri hidrasyonu, pH’ın ayarlanması ve (muhtemelen) UV korunmasına katkıda bulunurlar [14].

### 1.1.2.3. Filagrin Mutasyonları ve Epidermal Bariyer Disfonksiyonu

Filagrin (*FLG*) mutasyonları hastalık nedeni ve modifikasyonları içerisinde bugüne kadar en yaygın ve yoğun tanımlanmış tek-gen hasarıdır [15]. Her ne kadar bu mutasyonlar fonksiyonel bariyer hasarından sorumlu tutulsalar da, bu hasarın mekanizması halen aydınlatılabilmemiş değildir. Ancak insan denekler ve fare modelleri çalışmalarıyla önemli anlayışlar elde edilmiştir. Bu çalışmalar filagrin eksikliğinin farklılaşmaya özgü çeşitli etkiler yoluyla hastalık patogeneze katkıda bulunabileceğini göstermiştir [15].

Deri bariyerinin bütünlüğüne profilagrinin esas önemi 2006'da iktiyozis vulgaris'li hastalarda fonksiyon kaybı ile sonuçlanan mutasyonlar olan (loss-of-function mutations) R501X ve 2282del4 mutasyonlarının keşfiyle fark edildi [16,17]. Bu çalışmanın ardından çok kısa bir zaman içerisinde birçok çalışma yayımlandı [59]. Yapılan çalışmalar *FLG* mutasyonlarının topluma özgü olduğunu göstermiştir [Şekil 1.6.] [15,53]. Sık görülen R501X ve 2282del4 mutasyonları ve daha nadir görülen S3247X ve R2447X mutasyonları, yapılan çalışmalar sonucunda beyaz Avrupa popülasyonunda %7-10 olarak bulunmuştur. Sonrasında beyaz Avrupa kökenli popülasyonlarda 20'den fazla nadir ve aile-spesifik fonksiyon-kayı mutasyonlar *FLG* 'nin ekzon 3 bölgesinde keşfedilmiştir. Ancak bu mutasyonlar popülasyona spesifiktir ve diğer toplumlarda genetik epidemiyolojik çalışmaların temeli olarak kullanılamamaktadır. Asya popülasyonlarında yapılan çalışmalar sonucunda bu popülasyonlardaki *FLG* mutasyonlarının farklı olduğu saptanmış ve kendi mutasyon spektrumlarını göstermişlerdir [15,53]. Beyaz Avrupa popülasyonunda sık rastlanan yalnızca 2 mutasyon (R501X ve 2282del4) *FLG* mutasyonlarının %80'inden sorumluyken, Singapur/Çin'de sık rastlanan 8 mutasyon (E2422X, Q2417X, S2554X, S2889X, S3296X, R4307X, 3321delA ve 7945delA) *FLG* mutasyonlarının % 80'inden sorumludur [60]. Şaşırtıcı olarak Avrupa'da sık görülen R501X ve 2282del4 mutasyonları İtalyanlarda rastlanmamıştır [61].

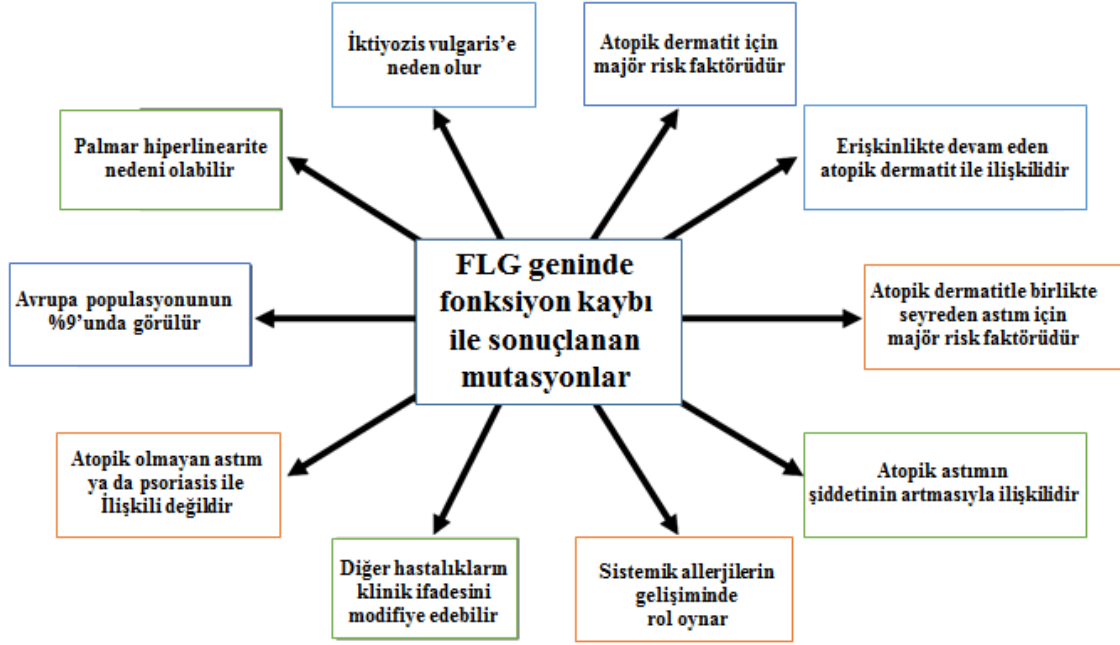
Bugüne kadar Etiyopya'da yapılan 40 vakalık bir çalışma haricinde Afrika popülasyonunda *FLG* mutasyonlarıyla ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Etiyopya'da yapılan çalışmada da yalnızca 1 tane (632del2) *FLG* mutasyonuna rastlanmıştır [53,62].



**Şekil 1.6.** Asya ve Avrupa popülasyonlarında tanımlanan *FLG* mutasyonları. Asya ve Avrupa popülasyonlarına özgü 49 kesilme mutasyonu (truncating mutation) tanımlanmıştır. Bu popülasyonlarda sık rastlanan mutasyonlar kırmızı, nadir ya da aileye-özgü mutasyonlar siyah oklar ile gösterilmiştir [15].

Tanımlanan *FLG* mutasyonları, anlamsız mutasyon ya da çerçeve kayması ile beraber delesyon/insersiyon mutasyonları olabilmektedir [13]. Birçok distal mutasyon, sınırlı da olsa profilagrin ekspresyonuna izin verir, ancak fonksiyonel filagrin alt ünitelerinin üretimi gözlenmez. Sık rastlanan R501X ve 2282del4 mutasyonları dur kodonu gibi etki eder ve filagrin proteini sentezlenmez. C-terminal bölgesindeki mutasyonlar *FLG* sürecinde önemlidir ve penetrasyonu azaltırlar [63,64].

*FLG* mutasyonlarının klinik önemi oldukça büyüktür ve [Şekil 1.7]'de gösterilmiştir [65].



Şekil 1.7. FLG mutasyonlarının klinik önemi [65]

### 1.1.3 Atopik Dermatit

#### 1.1.3.1. Atopik Dermatit Tanımı ve Sınıflandırılması

Atopik dermatit (AD), kaşıntılı cilt lezyonları, immünolojik bozukluk, bozulmuş epidermal bariyer fonksiyonu ve besin ve çevresel alerjenlere karşı Ig-E aracılı duyarlanma ile karakterize iltihabi bir hastalıktır [56]. İlk kez 1930'larda Hill ve Sulzberger tarafından atopik dermatit teriminden bahsedilmiştir [66].

Atopik dermatitin klinik bulguları genellikle yaşa göre 3 aşamada tanımlanabilir [Şekil 1.8.A, B, C] [24]. Bebeklikte genellikle ilk ekzematöz lezyonlar yanaklar ve kafa derisi üzerinde ortaya çıkar. Birkaç hafta sonra kaşıntı ve kaşıntı dolayısıyla gelişen kabuklanma başlar. Çocukluk döneminde fleksür bölgelerinde, ensede ve ekstremitelerin dorsal kısımlarında lezyonlar bulunur. Adölesan ve erişkin dönemde oluşan likenifiye plaklar fleksür, baş ve boynu etkiler. Her 3 aşamada da kaşıntı gün boyu devam eder, geceleri daha da kötüleşerek uyku kaybına neden olur ve yaşam kalitesini düşürür [24].

Akut AD deri lezyonlarında [Şekil 1.8.D] yoğun kaşıntılı eritematöz papüller; ekskoriasyon ve seröz eksüdasyon ile ilişkilidir [18]. Akut ekzematöz plak ve eklerin histolojik özelliği epidermal hücrelerarası ödem (spongiosis) ve dermiste belirgin



perivasküler lenfosit, monosit, makrofaj, dentritik hücreler ve birkaç eozinofil infiltrasyonudur [24].

Kronik AD deri lezyonları [Şekil 1.8.E], kronik inflamasyon sebebiyle doku değişikliğine neden olur (üst tabakanın hipertrofisi). Bu deri lezyonları dermis ve kuru fibrotik papüller içerisinde artan kollajen depolanması ve artan deri likenifikasyonu ile kalınlaşmış plaklarla ilişkilidir. Dermal mononükleer hücre infiltrasyonunda makrofajlar hakimdir. Enflamatuvar yanıtta eozinofiller de katılır [18,24].

1980'lerin sonlarında AD'nin ekstrinsik (alerjik ya da klasik) ve intrinsik (alerjik olmayan) olmak üzere 2 tipi olduğu kabul edilmeye başlandı. Ancak intrinsik tipin AD'nin ayrı bir formu olduğuna dair araştırmacılar arasında fikir birliği bulunmamaktadır ve bazı araştırmacılar bu tip AD'yi atopiform dermatit ya da pseudo-atopik dermatit olarak adlandırmaktadır [67,68]. AD'nin ekstrinsik ve intrinsik olarak 2 ayrı tipe ayrılmasında IgE-aracılı duyarlanma baz alınmıştır, yani besin ve çevre allejenlerine karşı spesifik IgE'nin varlığı ya da yokluğuna göre bir sınıflandırma yapılmıştır. İntrinsik tipte total serum IgE değeri değişmezken, ekstrinsik tipte yüksek IgE değerleri görülür. İntrinsik tipte protein olmayan antijenlere (ör, metal) duyarlanma gözlenirken, protein antijenlere (besin ve çevresel alerjenler) duyarlanma gözlenmez (*Malasseriya sympodialis* gibi bazı istisna alerjenler hariç negatif deri-prick test). Epidermal bariyer disfonksiyonu ve FLG mutasyonları ekstrinsik tipte ilişkili bulunurken, intrinsik tipte epidermal bariyer fonksiyonu korunur ve yapılan çalışmalarda ilişkili FLG mutasyonlarına rastlanmamıştır. İntrinsik tipin havayolu hastalıklarıyla (bronşiyal astım ya da alerjik astım) ilişkisi bulunmaz (atopik yürüyüşe ilerleyiş anlamlı ölçüde düşüktür). Ekstrinsik tipin patojenik faktörü Th2 iken, intrinsik tipte düşük Th2 faaliyeti gözlenir veya Th1 sitokin interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )'nın yüksek üretimi gözlenir. İntrinsik AD'nin nedenleri ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna rağmen ekstrinsik AD'den normal epidermal bariyer fonksiyonu ve IFN  $\gamma$  üretim potansiyeliyle ayırt edilebilmektedir [21].



**Şekil 1.8.** Atopik dermatitin klinik, histolojik ve immünokimyasal görünümü. A. 4 aylık bir bebekte yanak ve saç derisini tutan erken-başlangıçlı AD'nin başlangıç lezyonları. B. Yetişkinde klasik baş ve boyun AD lezyonları. C. Yetişkinde tipik, likenifiye fleksör lezyonlar. D. (hemotoksilen ve eosin) epidermiste spongotik alanı gösteren akut lezyonun tipik histolojik görünümü. Yıldız işareti belirgin perivasküler infiltrasyonu göstermektedir. E. (hemotoksilen ve eosin) epidermis kalınlaşmasıyla görülen kronik lezyon. Yıldız işareti belirgin perivasküler infiltrasyonu göstermektedir [24].

Atopik dermatitin daha çok klinik araştırmalarda şiddetini değerlendirmek için SCORAD (score of atopic dermatitis) indeksi kullanılır. Bu indekste hastalığın yaygınlığı, yoğunluğu (eritem, papül, ödem, likenifikasyon, kuruluk, soyulma), subjektif belirtiler (kaşıntı ve uyku kaybı) birlikte değerlendirilerek hastalık; hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılır. SCORAD'ı 0-15 olanlar hafif, 15-40 olanlar orta ve 40'tan yüksek olanlar ağır olarak değerlendirilir [69].

Atopik dermatit mekanizmasıyla ilgili 2 hipotez önerilmiştir. Birincisi; immünolojik bozukluk sebebiyle lokal inflamasyonun bir sonucu olarak epteliyal bariyer disfonksiyonuyla IgE duyarlanması görüldüğü şeklinedir. Diğeri ise epitelial hücrelerdeki intrinsik defekt sebebiyle oluşan epidermal bariyer disfonksiyonudur; immünolojik cevabın ikincil neden olarak ortaya çıktığını savunur [24]. Atopik dermatit üzerine yapılan çeşitli gözlemler sonucunda; genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin birbiriyle ilişkisiyle kompleks bir etiyolojiye sahip olduğu bilinmektedir [6]. *FLG* mutasyonlarının keşfi, bu kompleks hastalığın genetik temelini anlamamızdaki en önemli atılımı temsil etmektedir. *FLG* mutasyonlarının AD geliştirme riskini 1.2-13 kat artırdığı belirtilmiştir [59] Ancak unutulmamalıdır ki *FLG* mutasyonu taşıyanların %40'ında herhangi bir AD belirtisine rastlanmamıştır. Bu durum son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında *FLG* deri ekspresyonunun IL-4 ve IL-13 sitokinleri tarafından atopik inflamatuvar cevap ile modüle edildiği düşünülmesine rağmen, henüz AD'de genetik ve çevre etkisi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir [13].

### **1.1.3.2. Atopik Dermatit Epidemiyolojisi**

Atopik dermatit sıklığı sanayileşmiş ölkelerde son 30 yıl içerisinde 2 ila 3 kat artarak çocuklarda %15-30, yetişkinlerde %2-10 olarak görölmektedir [70]. Atopik dermatit sıklıkla erken bebeklik döneminde başlar. Atopik dermatit vakalarının %45'i ilk 6 ayda, %60'ı ilk yılda ve % 85'i 5 yaşından önce başlar. Yaşamlarının ilk 2 yılı iğerinde hastalıktan etkilenen çocukların %50'sinde IgE duyarlılığı gözlenmez, ancak hastalığın seyri sırasında IgE duyarlılığı da ortaya çıkar [71]. Çocukların %70 kadarı adölesandan önce remisyona girer. Hastalık erişkin yaşta da başlayabilir, bu hastaların önemli bir kısmında IgE duyarlılığı gözlenmez [72]. Atopik dermatit prevalansının kentsel kesimlere kıyasla kırsal kesimlerde daha düşük olması, erken çocukluk döneminde alerjik ajanlara maruz kalınmaması sebebiyle alerjik hastalıkların ortaya çıktığını savunan hijyen

hipoteziyle açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak bu kavram son yıllarda atopik dermatit açısından sorgulanmaktadır [24].

Son zamanlarda ekstrinsik ve intrinsik AD 'nin insidansı üzerine pekçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara göre ekstrinsik ve intrinsik AD'nin insidansı; Alman çocuklarında %73-%27 ve %63-%37, Macar erişkinlerde %88-%12, yaşı 13-37 aralığında olan Hollandalı hastalarda %78.2-%21.8 ve Korelilerde yaklaşık %80-%20 olarak gösterilmiştir. Bu veriler ışığında ekstrinsik AD'nin başlangıç formu olduğu düşünülen intrinsik AD'nin, AD'li hastaların %20'sini oluşturduğu bildirilmiştir [21]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada AD sıklığı %8.1 olarak tespit edilmiştir [73].

Ekstrinsik AD'de epidermal bariyer disfonksiyonu bulunmaktadır [21]. Yapılan çalışmalar sonucunda FLG mutasyonu taşıyan AD'li hastaların yaklaşık %25-50 oranında olduğu gösterilmiştir [74].

### **1.1.3.3. Atopik Dermatit Genetiği**

Atopik dermatit gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanan kompleks genetik bir hastalıktır [Şekil 1.10.] [24,75]. Genel olarak AD'nin gelişmesinde genetik yatkınlığın bir ön koşul olduğu bilinmektedir. Birçok AD'li hastanın aile hikayesinde alerjik hastalıklar (astım, alerjik rinit, besin alerjisi) bulunmaktadır. Ancak yine de hastalığın tetiklenmesi için çevresel faktörlerle genetiğin etkileşimi gerekli görülmektedir [26]. Yapılan ikiz çalışmalarında AD görülme sıklığı; monozigot ikizlerde %77 iken dizigotik ikizlerde %15 olarak bulunmuştur [24].

Yapılan farklı gen linkaj çalışmalarında çeşitli kromozom bölgeleri AD ile ilişkili bulunmuştur. Bu bölgelerin çoğu, AD'nin patogeneğinde önemli rolleri olan proteinleri kodlayan aday genleri içerir [22]. AD ve genetik varyantı üzerine yayınlanan ilk çalışmanın ardından pek çok çalışma yapılmıştır. Yayınlanmış 111 çalışmada 81 gen tanımlanmış, bu 81 genin yarısından fazlası (46 gen) üzerine en az bir pozitif ilişkili çalışma bulunmaktadır. Bu 46 genin 13'ünün (*FLG* (*filagrin*), *IL4* (*interlökin 4*), *IL4RA* (*interlökin 4 reseptör*), *SPINK5* (*serin peptidaz inhibitör, kazal tip 5*), *CMA1* (*kimaz 1, mast hücre*), *IL13* (*interlökin 13*), *RANTES* (*kimokin C-C motif ligand 5*), *CD14* (*CD 14 molekülü*), *DEFB1* (*defensin beta 1*), *GSTP1* (*glutatyon S- transferaz*), *IL18* (*interlökin 18*), *NOD1* (*nükleotid-bağlayan oligomerizasyon domain 1*), *TIM1* (*T-hücre membran protein*

1)) en az 1 bağımsız çalışmada filament-toplayıcı protein ile ilişkisi gösterilmiştir. *FLG* bu genler içerisinde en çok çalışılan gen olmuştur [75,76].

Yapılan bir çalışmada AD ile ilişkili immün bozukluğa yol açan genler gösterilmiştir [Şekil 1.9]. Bu çalışmanın ileride yapılacak olan genetik ilişkili çalışmalar için en uygun adayların seçiminde önemli bir yarar sağlayabileceği düşünülmektedir [75].

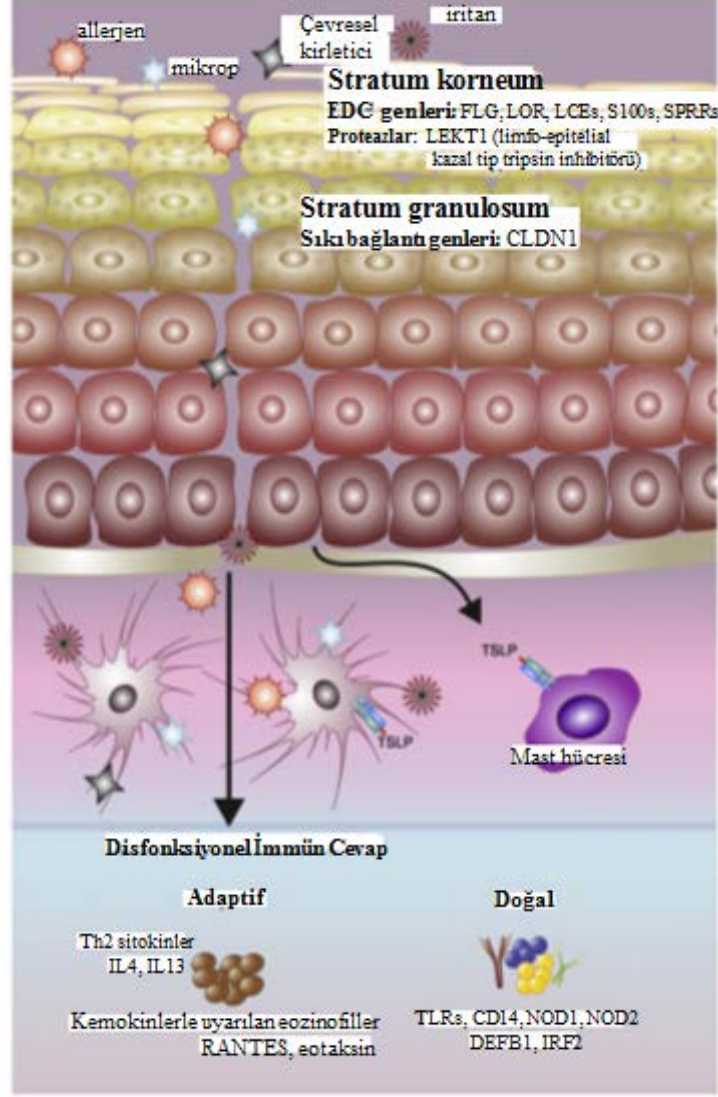
Antijen sunan, hücre-aracılı ve humoral immün cevap yolağı	Hücre sinyali ve etkileşimleri, hücre hareket ve hematolojik sistem gelişim ve fonksiyon yolağı
CD14 (monosit farklılaştırma antijen)	BCL2A1 (BCL2-ilişkili protein A1)
GATA3 (GATA-bağlayıcı protein 3)	BDNF (beyin türevli nörotrofik faktör)
IL4	RANTES (Aktivasyon sonucunda regüle olan, Normal T-hücresinde eksprese edilen ve salınan)
IL18	CSF2 (koloni stimüle edici faktör2)
NOD1 (nükleotid-bağlayan oligomerizasyon domain 1)	GSTP1 (glutatyon S-transferaz1)
TLR2 (Toll-benzeri reseptör 1)	IL5
	IL12B
	IL12RB1
	SOCS3(Sitokin sinyal supresör3)

**Şekil.1.9.** AD ile ilişkili immün bozukluğa yol açan genler [75].

AD'li hastalarda enfeksiyon yatkınlığı ve deri kolonizasyonu artmıştır ve birçok immün fonksiyon geninin bu yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu konuyla ilgili AD üzerine yapılan gen ilişkili çalışmalar; *TLR2* (*Toll-benzeri reseptör 1*), *NOD 1* ve *NOD 2* (*nükleotid-bağlayan oligomerizasyon domain 1 ve 2*), *CD14* (*interlökin 14*) ve *DEFB1* ( $\beta$ -*defensin 1*)'i içermektedir. Bu genler sadece AD'ye özgü değildir, ancak hastalığın klinik fenotipine katkıda bulunduğu bilinmektedir.

AD'li hastalarda belirgin olarak gözlenen bozulmuş epidermal fonksiyonla ilişkili olarak kromozom 1q21'de bulunan EDC ile ilişkili pekçok gen çalışılmıştır. Bu genler içerisinde *FLG*, AD ile en çok ilişkisi olduğu düşünülen ve üzerinde en çok çalışılan gen olmuştur [75,76]. Yapılan bir çalışmada ciddi bir viral komplikasyon olan *Eczama herpeticum* (*EH*)'u bulunan AD'li hastalarda viral enfeksiyonu bulunmayanlara göre R501X mutasyonu 3 kat daha fazla saptanmıştır [77].





**Şekil 1.10.** AD yatkınlığını arttıran genlerin tanımlanmasında genetik epidemiyolojik yaklaşımlar. AD'nin kompleks patolojisi; epitelyal bariyerin hasarı ve bozulmasıyla alerjenler, mikroorganizmalar, çevresel kirleticiler ve iritanların epidermis ve dermise nüfus etmesini ve sonuçta antijen-sunan hücrelerle (langerhans hücreleri ve dermal dentritik hücreler) etkileşimiyle oluşan immün yanıtı içerir. SC'nin yapısı, *FLG*, *lorikrin* (*LOR*), *LCEs* (*kornifiye zarf genlerin geniş bir grubu*), *S100s* (*S100 kalsiyum bağlayıcı protein genleri*), *SPRRs* (*küçük prolin zengin protein genleri*), *SCCE* (*stratum korneum kimotriptik enzim kodlayan gen*)'nin de içinde bulunduğu EDC genlerindeki hasar sonucu bozulur. TJ'lerle ilişkili *CLDN 1* (*klaudin 1*) genindeki hasarlar da SC'nin bariyer görevinin bozulması üzerine etkilidir. *TLRs*, *CD 14*, *NOD 1*, *NOD 2*, *DEFB 1* ve *IRF 2* (*interferon regülatör faktör 2*)'ninde içinde bulunduğu doğal immün cevabın bozulmasının IgE aracılı Th2 cevabın oluşmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [75].

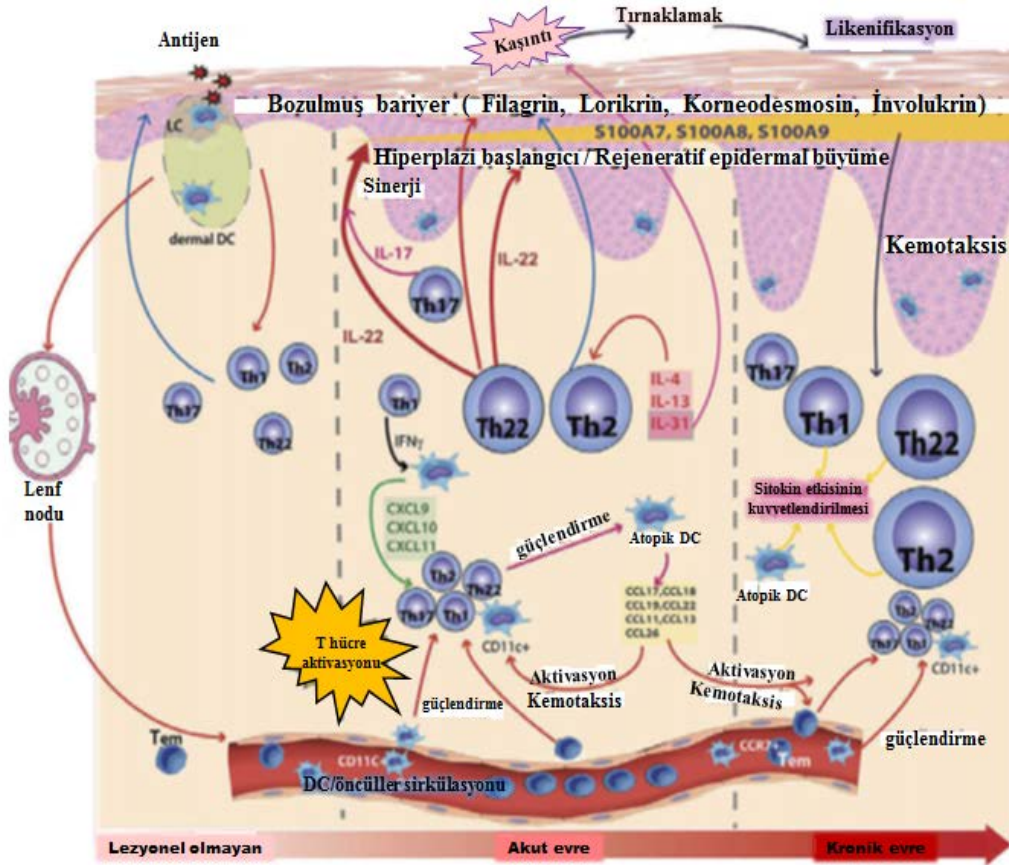
#### 1.1.3.4 Atopik Dermatit İmmünopatolojisi

AD'nin patofizyolojisi; çeşitli genler, konak ortamları, enfeksiyöz ajanlar, bozulmuş epidermal bariyer fonksiyonu ve immünolojik cevapların birbiriyle etkileşiminin kompleks bir ürünüdür. AD deri inflamatuvar yanıtları; T lenfositler, dendritik hücreler (DCs), makrofajlar, keratinositler, mast hücreleri ve eozinofillerin aktivasyonu ile karakterizedir [18].

İki fiziksel bariyer (filagrin (*FLG*) ve sıkı bağlantılar (TJs)) yıkıldığında mikrobiyal invazyon ve replikasyonu önlemek için hızlı bir şekilde doğal immün cevap başlatılır. Derideki keratinositler ve antijen sunan hücrelerde bir dizi doğal immün reseptör bulunur, bunlardan en bilineni (TLRs) toll benzeri reseptörlerdir. Doku ya da mikrobiyal hasar durumunda TLR'ler uyarılır; antimikrobiyal peptitler, sitokinler ve komokinlerin salınımının gerçekleştirilmesi ve TJ'lerin sıkı bağlantıları güçlendirilmesi ile alerjen ve mikrobiyal penetrasyon engellenmeye çalışılır. AD'li hastalarda yapılan çalışmalar; TLR'lerin fonksiyonunda azalmanın olduğunu, *S. aureus* ve viral replikasyonu kontrol etmek için keratinositler tarafından salgılanan antimikrobiyal peptitlerin üretiminde de bozukluk olduğunu göstermektedir. AD'li hastalardaki bu bozuklukların, mikrobiyal kolonizasyon ve kronik deri inflamasyonuna zemin hazırladığı düşünülmektedir [78,79]. Ayrıca bozulmuş epidermal bariyer, deride düşük su içeriği ve yüksek asidik deri yüzeyi (~5.0) patojenlerin SC'den geçişini kolaylaştırmaktadır. En iyi karakterize edilen patojenlerden olan *S. aureus*, normal ya da atopik olmayan populasyonlarda %5-%30 oranında görülürken, AD'li hastalarda bu oran yaklaşık olarak %90'ları bulmaktadır [80].

AD'nin akut fazında immün cevap; Th2 sitokinler (IL-4, IL-13, IL-31), Th22 sitokin, IL-22 ile ilişkilidir [Şekil 1.11.]. Bu sitokinler epidermal farklılaşmayı azaltarak filagrin ve antimikrobiyal peptit ekspresyonunun azalmasına katkıda bulunur. IL-31 epidermal farklılaşma üzerindeki önleyici etkisine ek olarak kaşıntıyı indükler. Bu kompleks sitokin profili ve keratinositlerin apoptozunu indükleyen IFN- $\gamma$  ile akut AD lezyonlarının oluşumu gözlenir. Bu etkinin deride T hücre aktivitesini uyaran dendritik hücrelerinin kontrolünü sağlayan IL-10 ile dengelenmeye çalışılabileceği düşünülmektedir. Ancak son yapılan çalışmalarla IL-10'un bu koruyucu etkisinin AD'li hastalarda kortikotropin salgılatıcı hormonun (CRH) etkisiyle IL-10'un baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca Th 17 ve IL-17'ün sadece psoriasis aracılık ettiği düşünülürken son yapılan çalışmalarla AD'de de etkili olduğu tespit edilmiştir [78].

AD'de deride, Langerhans hücreleri (LCs) ve inflammatuar dendritik epidermal hücreler (IDECs) olmak üzere iki farklı antijen sunan dendritik hücre (DCs) bulunmaktadır. Dendritik hücreler çeşitli deri hastalıklarında T hücre cevabının başlatılmasında anahtar bir rol üstlenirler. Alerjenler tarafından dendritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan FcεRI reseptörlerinin uyarılmasıyla kemotaktik cevap oluşur ve T hücreleriyle IDEC'lerin toplanmasıyla immün cevap gerçekleştirilir. AD'de epidermal keratinositlerde artan sitokin timik stromal lenfopoyetin (TSLP) ile dendritik hücrelerden Th2 farklılaşmasında artış gözlenir. IL-25 ve IL-33, keratinositlerin de içinde bulunduğu birden fazla hücre tipi ve doğal lenfoid hücreleri de Th2 yanıtını artırır ve eozinofil ve mast hücrelerini aktive edebilir. Mekanik yaralanma, alerjen maruziyeti ve mikrobiyal enfeksiyon durumunda TSLP, IL-25 ve IL-33 artar ve böylece Th2 yanıtı oluşur [18,23,78].



Şekil 1.11. Atopik dermatitin farklı evrelerinde immünolojik yollar [78].



#### **1.1.4. Besin Alerjisi**

##### **1.1.4.1. Besin Alerjisi Tanımı ve Sınıflandırılması**

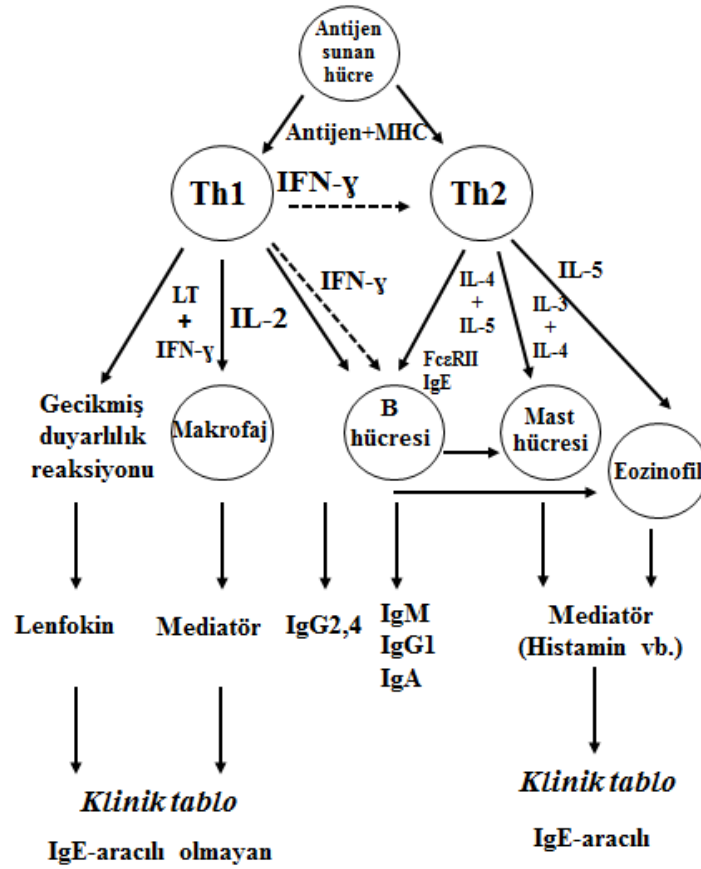
Besin alerjisi, besine karşı verilen immün cevabı ifade eder [81]. 2010 yılında US National Institutes of Alergy and Infectious Disease (NIAID) tarafından besin alerjisi ‘bir besine karşı verilen tekrarlı immün cevap sonucunda oluşan olumsuz sağlık etkisi’ olarak tanımlanmıştır [82]. Besin alerjilerine karşı verilen bu immün cevabı; IgE aracılı, IgE aracılı olmayan ve ikisinin karışımı olan karışık tip olarak sınıflandırmak mümkündür [29].

IgE aracılı reaksiyonlar, tetikleyici besinin sindirimi ya da tetikleyici besine maruz kalınma sonrasında genellikle 2 saat içerisinde semptomların akut başlangıcı ile karakterize edilirler [29]. En yaygın olarak bilinen besin alerjisi tipidir [30]. Alerjik duyarlılık, alerjen-özgün B lenfositlerden farklılaşmış olan plazma hücreleri tarafından besin-spesifik IgE (sIgE) antikoları oluşturulduğunda meydana gelir. sIgE antikoları kan bazofil ve doku mast hücrelerinin yüzeyine bağlanır. Besine tekrar maruz kalındığında besin yüzeyindeki antijenik proteinler ile sIgE antikoları arasında histamin ve lökotrienler gibi bazofil ve mast hücrelerinden salınan mediyatörler aracılığıyla çapraz bağlar kurulur ve reaksiyon gerçekleşir. IgE aracılı reaksiyona sahip besin alerjili bireylerde klinik bir semptom olmaksızın besin alerjenlerine karşı alerjik sensitizasyona sahip olabilirler. Bu yüzden diğer pek çok faktörün klinik cevabı etkilediği düşünülmektedir. Besin-duyarlı bireylerde klinik cevap mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, besin alerjisi teşhisinde besin-özgün IgE ölçümü kullanılır. Patofizyolojisine göre IgE aracılı besin alerjisiyle ilişkili hastalıklar içerisinde; oral alerji sendromu, ürtiker, anjiyoödem, anafilaksi gösterilmiştir [29,30,83].

IgE aracılı olmayan immün cevap, tetikleyici besine maruz kalımdan 2-6 saat, bazen daha uzun zamanda ortaya çıkar, bu yüzden besin alımının hemen ardından reaksiyon görülmeyebilir [84]. İmmünolojik reaksiyonlarında spesifik besin proteinleri tarafından aktive edilen T hücreleri görülür. Patogenezindeki farklılığın besin-özgün mukozal T hücreleri tarafından salgılanan Th2 sitokinleri ve T regülatör sitokinlerin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir [83]. IgE aracılı olmayan reaksiyonlarda IgE’den başka immüoglobulinleri içerdiği varsayılmaktadır, ancak tanı yöntemi henüz tam olarak

belirlenememiştir. Enterokolit, enteropati, proktokolit, çölyak hastalığı gibi klinik tablolara neden olabilir [30].

Karışık tip besin alerjilerinde hem IgE aracılı hem de IgE aracılı olmayan reaksiyonları görmek mümkündür. Bu tip ile eşlik eden hastalıklar arasında; eozinofilik özofajit, eozinofilik gastroenterit ve atopik dermatit gösterilebilir [30]. [Şekil 1.12.]’te besin alerjisinde görev alan T yardımcı hücrelerin 2 tipinin reaksiyon sistemleri gösterilmiştir [85].



**Şekil. 1.12.** Besin alerjisinde görev alan T yardımcı hücrelerinin 2 tipinin reaksiyon sistemleri [85].

#### 1.1.4.2. Besin Alerjisi, Atopik Dermatit ve FLG İlişkisi

Atopik dermatit ve besin alerjisi arasındaki ilişki, immünolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmadığı için karmaşık bir konu olarak kabul edilmiştir. Ancak yayınlanan çalışmalar açıkça besin alerjilerinin AD’li hastalarda semptomları indüklediğini göstermektedir [31]. AD’nin geç evresinde besinin kutanöz reaksiyonlarda küçük bir etkisinin olduğu, ancak hastalığın ortadan ağıra doğru geçtiği erken dönemde genç

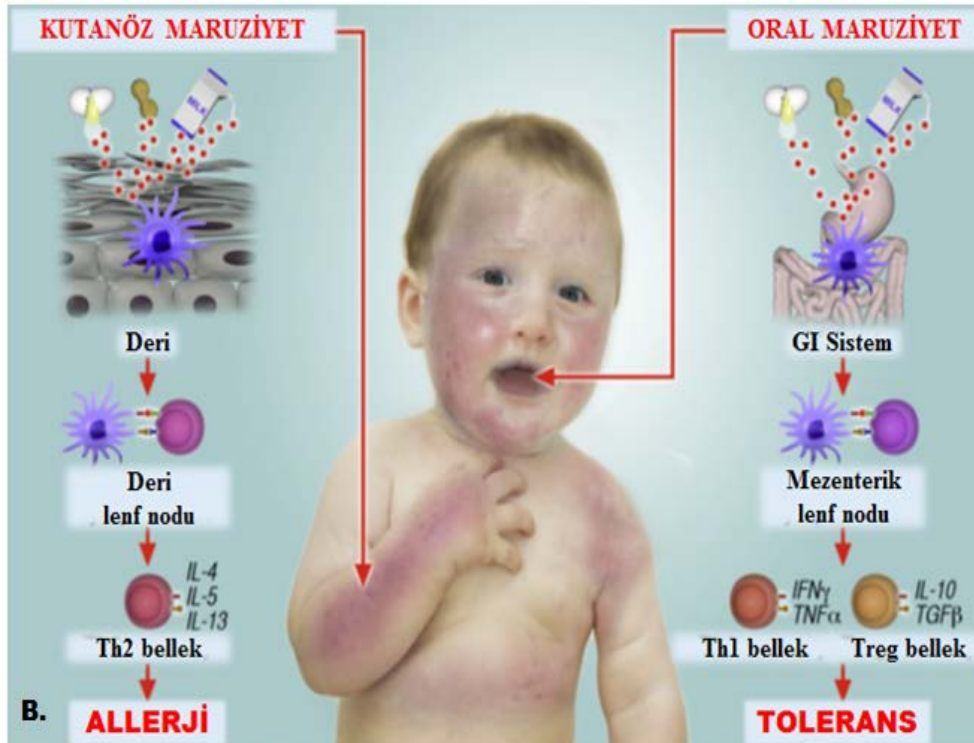
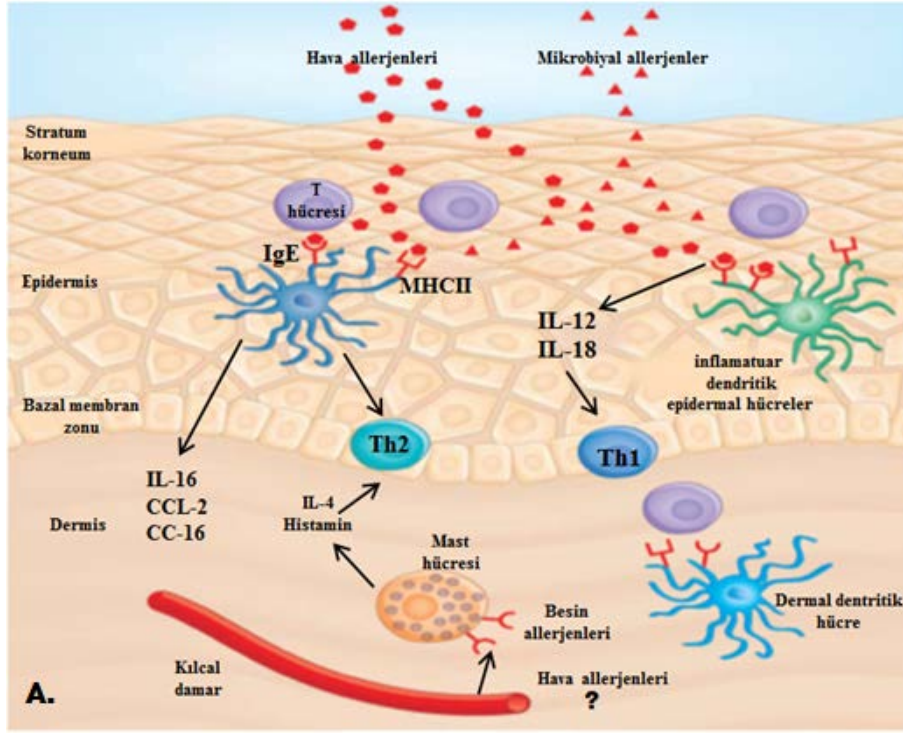
infantlarda AD'nin kutanöz reaksiyonlarının şiddetleneceği çalışmalarda gösterilmiştir [86]. Erişkin AD hastalarında besin alerjisinin çok az, bebeklik ve okul öncesi çocukluk döneminde yüksek oranda görülmesinin nedeni, hala hastalıklarla ilgili mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması sebebiyle açıklanamamaktadır [87,88]. Ortadan ağıra doğru ilerleyen sürekli AD'li hastalarda IgE aracılı besin alerjisinin prevalansının daha yüksek, yaklaşık %35 olduğu tahmin edilmektedir [89]. Hastalığı ağır-orta AD şeklinde ilerleyen yaklaşık her 3 çocuğun 1'inde besin alerjisi bulunduğu belgelenmiştir [28].

İnek sütü, tavuk yumurtası, fıstık, buğday, soya, fındık ve balık AD'li çocuklarda besin alerjisinin >%90'ından sorumludur [28]. Yapılan uluslararası bir kohort çalışmasında 11.5-22.5 aylık 2222 AD'li infantın %64'ünde 3. aylarından önce yumurta ve/veya inek sütü ve/veya fıstığa karşı IgE aracılı besin duyarlılığı geliştirdikleri bildirilmiştir [90]. Yapılan çift-kör plesebo kontrollü bir çalışmada da 3-18 aylık AD'li 75 çocukta, 1, 2, 3 ve 4 besine karşı besin alerjileri sırasıyla %60, %28, %8 ve %4 olarak bulunmuş ve en çok besin sorununun süt, yumurta ve fıstığa karşı olduğu gösterilmiştir [82].

Son yıllarda *FLG* mutasyonlarının AD'nin gelişiminde olası bir mekanizma olarak düşünülmesi sebebiyle, AD ve besin alerjisi ilişkisi yeniden gündeme gelmiştir. Bu gendeki değişikliklerin besin alerjilerine kutanöz maruziyette, derinin proteinlere geçirgenliğini artırarak alerjik duyarlılık riskini arttırmada anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir [27,91]. İngiliz, Alman ve İrlandalı fıstığa karşı besin alerjisi bulunan bireylerde R501X ve 2282del4; Kanadalı fıstığa karşı besin alerjisi bulunan bireylerde R501X, 2282del4, R2447X ve S3247X *FLG* mutasyonlarının incelendiği bir çalışmada; besin alerjisi ve *FLG* mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [92].

Alerjenler deriye epidermis ya da kan yoluyla ulaşabilirler. [Şekil 1.13.A] Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma besinlerin ağız yoluyla alınımının immün tolerans geliştirebileceğini, ancak besin antijenleriyle deri yoluyla temasın alerjik duyarlılık oluşumuna yol açacağını ileri sürmektedir. Çift-alerjen maruz kalma hipotezi de bu bulguları açıklamak için ileri sürülmüştür. Çift-alerjen maruz kalma hipotezi; besin alerjenlerine deri yoluyla maruz kalındığında duyarlılık oluşacağını, oysa alerjik proteinlerin tüketilmesi sonucu oral toleransın gelişeceğini savunmaktadır. [Şekil 1.13.B] Hipotez alerjen ve alerjene maruz kalma yerinin tolerans ya da duyarlılık gelişimini belirleyen önemli bir faktör olduğunu savunsa da başka faktörlerin de immünolojik cevapta etkili olduğu düşünülmektedir.

Yayınlanan birçok çalışma, atopik dermatit tipi duyarlanmanın atopik yürüyüşe neden olabileceğini ileri sürmektedir [93-95].



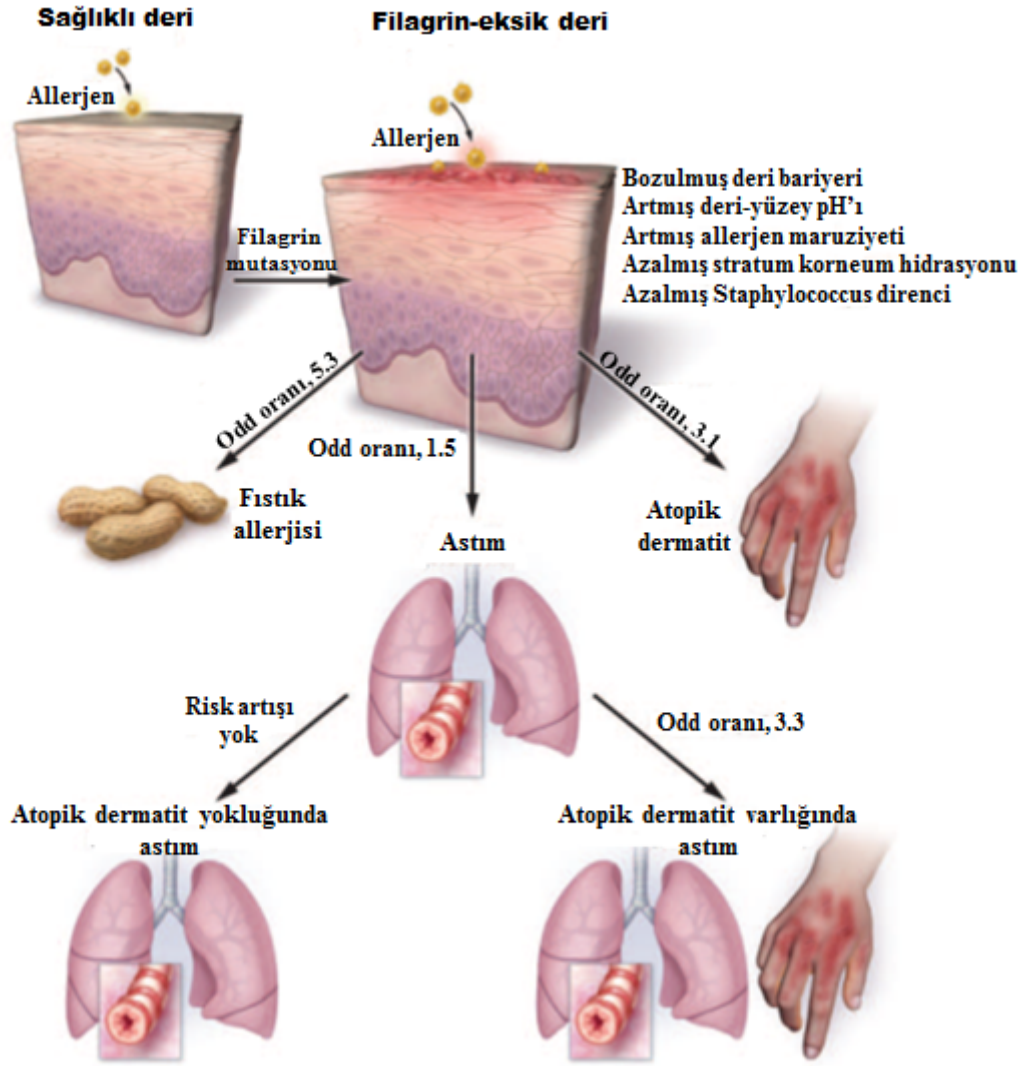
Şekil 1.13. (A) AD 'de kutanöz inflamasyonda allerjenlerin etkisi [95]. (B) Besin alerjisinin patogenezinde çift-allerjen maruz kalma hipotezi [94].

### 1.1.5. Atopik Yürüyüş

Atopik yürüyüş; atopik hastalıkların klinik belirtilerinin tipik bir diziyle ilerlemesiyle karakterizedir ve atopik oluşumların doğal gelişim evrelerini ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır [96]. Bu süreç genellikle erken bebeklik evresinde atopik dermatit ve besin alerjisiyle başlar, çocukluk ve erişkin dönemde solunum yolu hastalıklarıyla (astım, alerjik rinit) devam eder [97]. Yapılan çalışmalar; AD'li çocukların %40-%50'sinin atopik yürüyüşten etkilendiğini, ağır AD'ye sahip hastaların %70'inde, orta AD'ye sahip hastaların %30'unda ve genel populasyonun %8'inde astım geliştiğini göstermiştir [89,86]. Epidemiyolojik veriler yaklaşık olarak ortadan ağıra geçen AD'li her 3 çocukta birinde besin alerjisi bulunduğunu göstermektedir. Ancak besin alerjisi ve AD ile birlikte görüldüğünden, besin alerjisinin atopik yürüyüşe tek başına olan etkisi bilinmemektedir [28,34].

Atopik yürüyüşün patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllara kadar atopik yürüyüşün içerisinde bulunan farklı hastalıkların ortak özelliği spesifik IgE değeri olması, bu değer ve immün sistem anomalilerinin atopik yürüyüşte merkezi bir rol oynadığı düşünülmekteydi. Ancak son yapılan çalışmalarla, epidermal bariyerdeki hasarların oluşumunda önemli bir rolü olduğu düşünülen *FLG* mutasyonlarının da AD başta olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir [Şekil 1.14.] [15,36,98].

*FLG* mutasyonlarıyla atopik astım riski sadece astımın AD ile görüldüğü çocuklarda artmaktadır. Bu durum havayolu epitelinde de deride olduğu gibi *FLG* ekspresyonunun olduğunu ve benzer bir rol üstlendiğini düşündürmüştü, ancak yapılan çalışmalar havayolu epitelinde *FLG* ekspresyonunun olmadığını göstermiştir [99]. AD ve astım ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak AD ilişkili astımın *FLG* mutasyonlarıyla ilişkisi; deri epitelyal bariyerinin bozulması sonucu oluşan alerjik duyarlılığın lokal ve sistemik immün cevaba neden olduğu hipoteziyle açıklanmakta ve *FLG*-hasarlı fare çalışmalarıyla bu hipotez desteklenmektedir [75]. Yapılan bir çalışmada da, AD ve besin alerjenlerine duyarlılığı olan infantların yaşamlarının ilk 3 yıllarında *FLG* mutasyonlarının varlığıyla astım geliştirmelerinin pozitif prediktif değeri %100 olarak gösterilmiştir [97].



**Şekil 1.14.** Filagrin haplo yetmezliği (haploinsufficiency) ve kompleks hastalıkların artma riski. Filagrin haplo yetmezliği filagrin proteininin ekspresyonununun %50 azalması olarak tanımlanmaktadır. *FLG* mutasyonlarının fıstık alerjisi, AD ve astım risklerinin odds oranları gösterilmiştir. Fıstık alerjinin odds değeri mevcut olan tek çalışmadan alınırken, AD ve astım odds değerleri meta analizler baz alınarak gösterilmiştir [15].

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Kandan DNA İzolasyonu

R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonlarının araştırılması için gerekli olan DNA örnekleri; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Alerji Ünitesi'nde, Prof. Dr. Cansın SAÇKESEN ve ekibi tarafından kan örneklerinin toplanması ve kandan DNA izolasyonu yapılarak tarafımıza ulaştırılmıştır. R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonu için çalışmaya 458 hasta, 128 kontrol grubu birey dahil edilmiştir. Besin alerjisi tanısı alan hastalardan 8 tanesinin kronik hastalığı bulunmaktadır. Bunlardan 2'si mental motor retardasyon, 1'i hiper IgE, dolikosefali ve şüpheli immün yetmezlik, 1'i down sendromu ve konjenital kalp hastalığı, 1'i tüberoskleroz, 1'i kistik fibrozis, 1'i fenilketonüri ve 1'i netherton sendromu nedeniyle izlenmektedir. Kontrol grubu; hastaneye başvurduğunda aktif hastalık şikayeti olmayan, özgeçmişinde herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan çocuklardan oluşmaktadır. Çalışma için gerekli etik kurul izni ve çalışmaya dahil olan kişilerden birey onam belgesi alınmıştır.

### 2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu tez çalışmasında sağlıklı ve hasta bireylerden alınan kanlardan izole edilmiş DNA'lardan *FLG* geninin 3. ekzonun 1. tekrarında bulunan R501X ve 2282del4 gen bölgelerinin amplifikasyonları bazı değişikliklerle birlikte Saiki ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre yapılmıştır [100]. PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere dizayn edilen primerler şekil üzerinde gösterilmiştir [Şekil 2.1.].

12481 ACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGCCACTGGGCGCGGGCAAGCTTCATCTG  
12541 CAGTCAGCGATCGTGGACACCCGGGGTCTAGCGGTAGTCAGGCCAGTGACAGTGAGGGAC  
12601 ATTCAGAAAACTCAGACACACAATCAGTGTCCAGGCCACGGAAAGGCTGGGCTGAGACAGC  
12661 AGAGCCACCAAGAGTCCACACGTGGCCGGTCAGGGGAACGGTCTGGACGTTTCAGGGTCTT

**R501X ileri primer**

12721 CCCTCTACCAGGTGAGCACTCATGAACAGCCTGACTCTGCCCATGGACGGACCGGGACCA  
12781 GCACTGGAGGAAGACAAGGATCGCACCACGAGCAGGCAAGAGACAGCTCCAGGCATTTCAG

**R501X tek nükleotit değişimi (C/T)**

12841 CGTCCCAAGAGGGTCAGGACACCATTTCGTGGACACCCGGGGTCAAGCAGAGGAGGAAGGC  
12901 AGGGATCCCACCACGAGCAATCGGTAATAGGTCTGGACACTCAGGTTCCCATCACAGCC

**R501X ters primer-2282del4 ileri primer**

12961 ACACCACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCTCCCATGGGCAGTCAGGATCCAGAAGTGCAA  
13021 GCAGACAAAACGAAATGAGGAACAATCAGGAGACGGCACCAGGCACCTCAGGGTCACGTC  
13081 ATCATGAAGCTTCTCTCAGGCTGACAGCTCTAGACACTCACAGGTGGGCCAGGGACAAT  
13141 CATCGGGGCCAGGACAAGTAGGAACCAGGGATCCAGTGTTAGCCAGGACAGTGACAGTC  
13201 AGGGACACTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAAACCATCATGGAT  
13261 CTGCTCAGGAGCAGTCAAGAGATGGCTCCAGACACCCAGGTCCCATCACGAAGACAGAG  
13321 CTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTCCAGAAAATCAGGCACCTCGTCACACACAGAATT  
13381 CCTCTAGTGGACAGGCTGCGTCAATCCCATGAACAGGCAAGATCAAGTGCAGGAGAAAGAC  
13441 ATGGATCCCACCAGCTCCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCACCTGGGCACG  
13501 GACAAGCTTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCCGAGGGTCCAGTGGTAGTCAGGCCA  
13561 CTGACAGTGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCAGTGTTCAGGCCATGGACAGG

**2282del4 delesyon**

13621 CTGGTCACCATCAGCAGAGCCACCAAGAGTCCGCACGTGACCGGTGAGGGGAAAGGTCTC  
13681 GACGTTTCAGGGTCTTTCCTCTACCAGGTGAGCACTCATAAACAGTCTGAGTCTCTCCATG

**2282del4 ters primer**

13741 GATGGACAGGGCCAGCACTGGAGTAAGACAAGGATCCCACCATGAGCAGGCACGAGACA  
13801 ACTCCAGGCACTCAGCATCCCAGATGGTTCAGGACACCATTTCGTGGACACCCGGGGTCAA  
13861 GCAGAAGAGGAAGGCAGGGGTCCCACCACGAGCAATCGGTAGATAGGTCTGGACACTCAG

**Şekil 2.1.** PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere dizayn edilen primerlerin dizi üzerinde gösterimi

## PZR Reaksiyon Karışımı ve Koşulları

### R501X

• DNA	2 µl		
• 10 x Tampon	2,5 µl	94°C 4'	
• MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 µl	94°C 45''	} 32 Döngü
• dNTP Karışımı (2.5 mM)	1 µl	64°C 45''	
• İleri primer (F) (10 pmol/ µl)	1 µl	72°C 90''	
• Ters primer (R) (10 pmol/ µl)	1 µl	72°C 7'	
• dH <sub>2</sub> O	19,5 µl		
• <u>Taq DNA Polimeraz (2,5 ünite)</u>	0,5 µl		

Toplam hacim 25 µl



## 2282del4

• DNA	2 µl		
• 10 x Tampon	2,5 µl	94°C 4'	
• MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 µl	94°C 45''	} 34 Döngü
• dNTP Karışımı (2.5 mM)	1 µl	60°C 45''	
• İleri primer (F) (10 pmol/ µl)	1 µl	72°C 90''	
• Ters primer (R) (10 pmol/ µl)	1 µl	72°C 7'	
• dH <sub>2</sub> O	19,5 µl		
• <u>Taq DNA Polimeraz (2,5 ünite)</u>	<u>0,5 µl</u>		
Toplam hacim	25 µl		

**Taq DNA Polimeraz:** 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizatörler, 50% gliserol.

**10×Tampon:** 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl

Amplifikasyon sonunda örnekler elektroforez ile %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

### **2.3 PZR Temelli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Yöntemi**

Restriksiyon enzimleri, DNA'yı özgül tanıma bölgelerinden keserek, parçalara ayıran enzimlerdir. RFLP yöntemi; DNA'nın bu enzimler kullanılarak kesilmesi sonucunda elde edilen ürünlerin, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek bantlar halinde görüntülenmesi ve değerlendirilmesi esasına dayanır.

Çalışmamızda PZR ile çoğaltmış olduğumuz gen bölgeleri, değişime özgül restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modelleriyle kesim noktasının varlığı ya da yokluğuna göre bireylerde R501X ve 2282del4 polimorfizmlerinin bulunup bulunmadığı tespit edilmiştir.

## Restriksiyon Enzimleri ve RFLP Koşulları

### R501X

Restriksiyon Enzimi: *HinIII (NlaIII)*

*HinIII (NlaIII) Tanıma Dizisi*

5'... C A T G↓...3'

3'...↑G T A C ...5'

- PZR ürünü 10 µl
- dH<sub>2</sub>O 18 µl
- 10×Buffer G 2 µl
- *HinIII* 1 µl (U)
- Toplam 31 µl

Reaksiyon karışımı gece boyu 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 65°C'de 20 dakika sıcaklıkla ve hemen arkasından 6× durdurma tamponundan (%40 sükröz, %0,25 brom fenol mavisi, %60 10×TBE tamponu) her reaksiyon tübüne 2 µl eklenerek reaksiyonlar sonlandırıldı. *HinIII* kesimi sonucu elde edilen ürünler elektroforez ile %2' lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

### 2282del4

Restriksiyon Enzimi: *AdeI (DraIII)*

*AdeI (DraIII) Tanıma Dizisi*

5'...C A C N N N↓G T G...3'

3'...G T G↑N N N C A C...5'

- PZR ürünü 10 µl
- dH<sub>2</sub>O 18 µl
- 10×Buffer G 2 µl
- *AdeI* 0,8 µl (U)
- Toplam 30.8 µl

Reaksiyon karışımı gece boyu 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 6× durdurma tamponundan (%40 sükröz, %0,25 brom fenol mavisi, %60 10×TBE tamponu) her

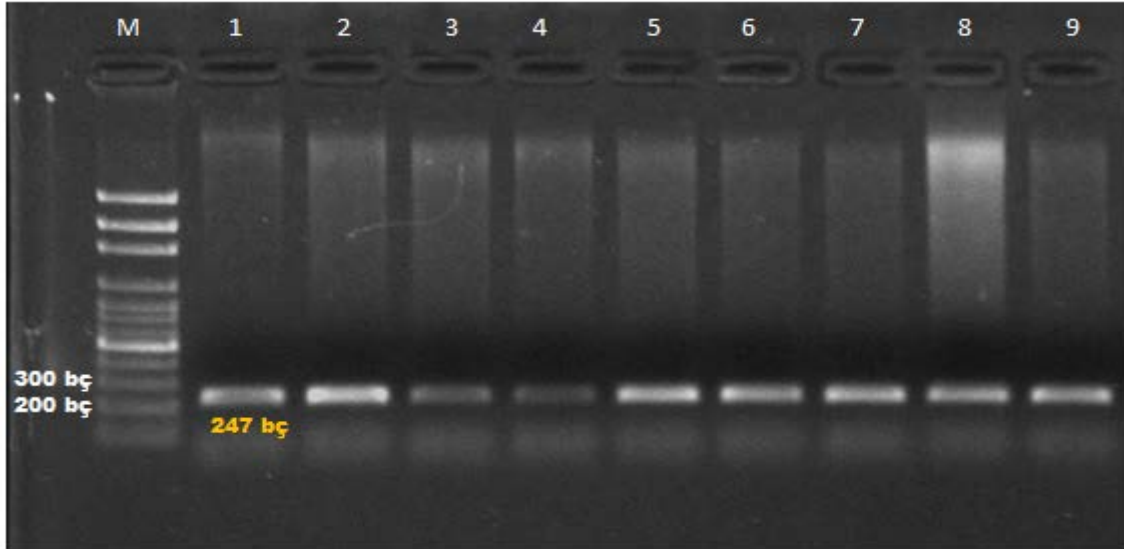
reaksiyon tüpüne 2 µl eklenerek reaksiyonlar sonlandırıldı. *AdeI* kesimi sonucu elde edilen ürünler elektroforez ile %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

### 3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. *FLG* R501X Mutasyonu Sonuçları

##### 3.1.1. PZR Sonuçları

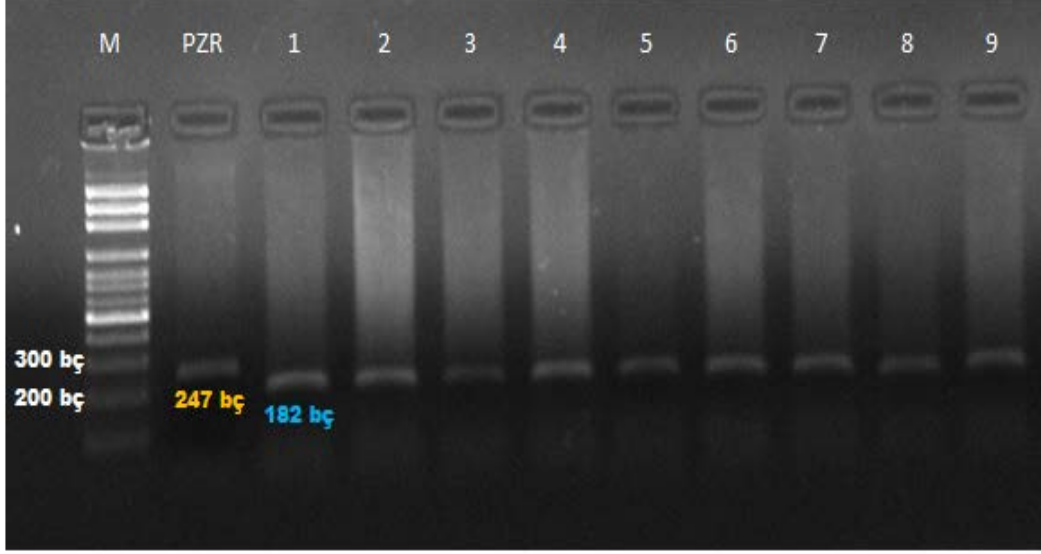
*FLG* geninin ekzon 3 bölgesindeki tekrar 1'de yer alan, C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren, 247 bç büyüklüğündeki bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** *FLG* geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren 247 bç'lik bölgenin PZR sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. (M: 100 bç'lik belirteç; 1-9: PZR ürünü 247 bç'lik bantlar)

##### 3.1.2. RFLP Sonuçları

*FLG* geninin ekzon 3 bölgesindeki tekrar 1'de yer alan, C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren, 247 bç büyüklüğündeki bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılmasından sonra; *HinIII* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim yapıldı. RFLP yöntemiyle yapılan kesim sonucu elde edilen ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



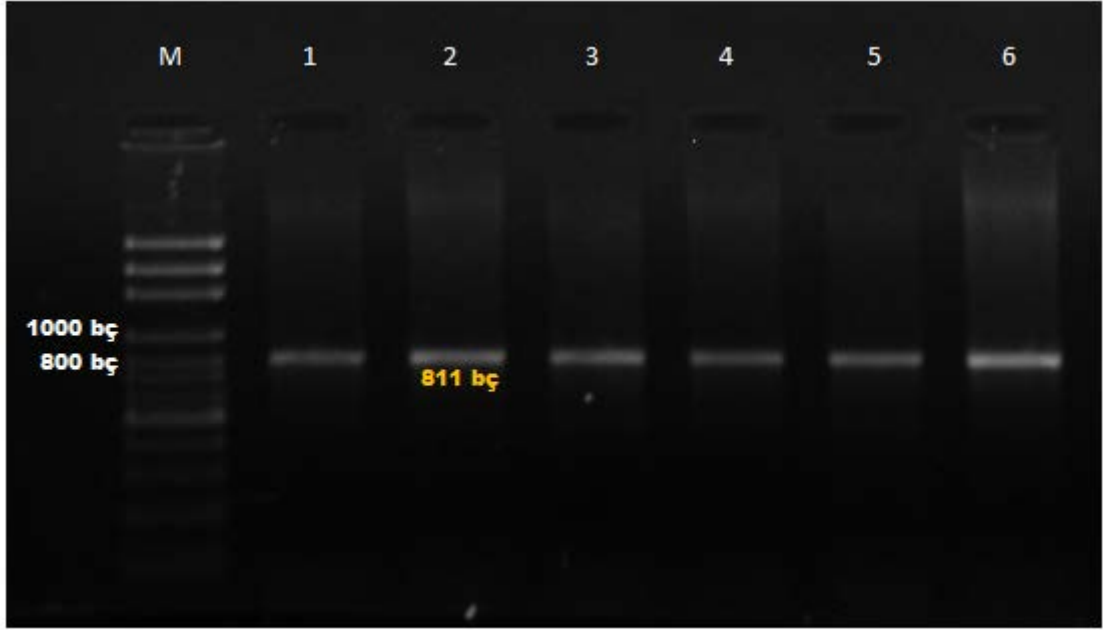
**Şekil 3.2.** *FLG* geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu içeren bölgenin *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi. (M: 100 bç'lik belirteç; PZR: kesilmemiş PZR ürünü; 1-9: kesilmiş yabancı tip)

*HinIII* enzimi reaksiyonlarında; *FLG* mutasyonu olmayan bireylerde (yabancı) PZR ürünleri kesime uğrarken, *FLG* mutasyonu olan bireylerde (mutant) PZR ürünleri kesime uğramaz. *HinIII* enzimiyle yapılan kesim sonucu 428 hasta, 128 kontrol grubu bireylerinde C/T tek nükleotit değişimi ile sonuçlanan R501X mutasyonunu bulunmadığından 182, 44 ve 21 bç'lik bantlar oluşmuştur. Kesim sonucu jel üzerinde yalnızca 182 bç'lik bant gözlenmiştir.

### 3.2. *FLG* 2282del4 Delesyonu Sonuçları

#### 3.2.1. PZR Sonuçları

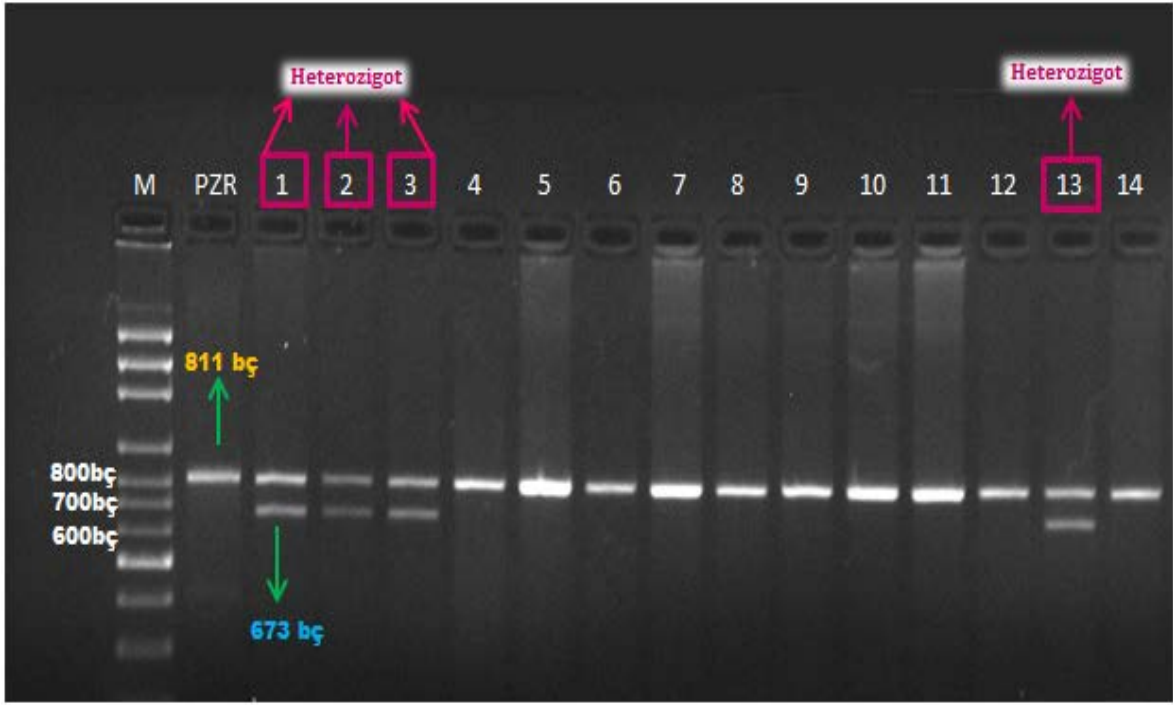
*FLG* geninin ekzon 3 bölgesindeki tekrar 1'de yer alan, /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren, 811 bç büyüklüğündeki bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** *FLG* geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren 811 bç'lik bölgenin PZR sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. (M: 100 bç'lik belirteç; 1-6: PZR sonrası 811 bç'lik bantlar)

### 3.2.2. RFLP Sonuçları

*FLG* geninin ekzon 3 bölgesindeki tekrar 1'de yer alan, /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren, 811 bç büyüklüğündeki bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılmasından sonra *AdeI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim yapıldı. RFLP yöntemiyle yapılan kesim sonucu elde edilen ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.4.'de gösterimiştir.



**Şekil 3.4.** *FLG* geninin 3. ekzon 1. tekrarındaki /CAGT/ delesyonu ile sonuçlanan 2282del4 mutasyonunu içeren bölgenin *AdeI* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi. (M: 100 bç'lik belirteç, PZR: kesilmemiş PZR ürünü; 1-3, 13: kesilmiş heterozigot mutant tip; 4-12, 14: kesilmemiş yabanıl tip)

*AdeI* enzimi reaksiyonlarında; *FLG* mutasyonu olan bireylerde (mutant) PZR ürünleri kesime uğrarken, *FLG* mutasyonu olmayan bireylerde (yabanıl) PZR ürünleri kesime uğramaz. Şekil 3.4'te 1-3 numaraları ile gösterilen kesim ürünleri hasta grubundaki, 13 numarası ile gösterilen kesim ürünü ise kontrol grubundaki heterozigot bireylerdir ve kesim sonucu jelde 811, 673 ve 134 bç'lik 3 ayrı fragment oluşmuş; jel üzerinde 811 ve 673 bç'lik bantlar gözlenmiştir. Geriye kalan 430 hasta ve 119 kontrol bireylerinde 2282del4 mutasyonu bulunmadığından *AdeI* enzimiyle kesime uğramamışlardır ve jel üzerinde 811 bç'lik bant görüntüleri bulunmaktadır.

### 3.3. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

R501X *FLG* gen mutasyonunu incelemek için çalışmamızda 458 hasta ve 128 kontrol grubu birey dahil edildi. Yapılan PZR-RFLP taraması sonucunda hem hasta hem de kontrol grubunda R501X gen mutasyonuna rastlanmamıştır.

**Çizelge 3.1.** R501X hasta ve kontrol grubu değerlendirmesi. (30 hasta grubu bireyi istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.)

	<b>Sadece Atopik Dermatitli Hastalar N= 41</b>	<b>Besin Alerjisine Atopik Dermatit Eşlik Eden Hastalar N= 259</b>	<b>Besin Alerjisine Atopik Dermatit Eşlik Etmeyen Hastalar N= 128</b>	<b>Sağlıklı Kontroller N= 128</b>
<b>Yaş* (yıl)</b>	1.5 (0.6-4.5)	1.0 (0.6-1.5)	2.0 (1.0-5.3)	2.4 (1.4-3.5)
<b>Cinsiyet (erkek) n,(%)</b>	27 (65.9)	181 (69.9)	84 (65.6)	75 (58.6)
<b>Eozinofil (%)*</b>	4.6 (2.8-7.8)	6.0 (3.5-9.2)	3.8 (2.4-7.1)	1.8 (1.2-2.9)
<b>Eozinofil sayısı* (/µl)</b>	400 (200-700)	600 (335-1100)	400 (200-662.3)	192 (100-300)
<b>Total IgE* (kU/L)</b>	29 (6.3-182)	91 (32.3-285.5)	99.5 (43.8-277.5)	11.2 (5.0-37.3)
<b>Astım n, (%)</b>	4 (9.8)	66 (25.5)	62 (48.4)	-
<b>Alerjik rinit n, (%)</b>	7 (17.1)	26 (10.0)	28 (21.9)	-

\*Medyan (çeyrekler arası aralık)

**Çizelge 3.2.** R501X hasta ve kontrol grubu mutasyon sıklığı.

	<b>R501X mutasyon sıklığı %</b>	
	<b>Hasta grubu n: 428</b>	<b>Kontrol grubu n: 128</b>
<b>CC (yabanıl)</b>	%100	%100
<b>CT (heterozigot)</b>	%0	%0
<b>TT (homozigot)</b>	%0	%0

2282del4 *FLG* gen mutasyonunu incelemek için çalışmamızda 458 hasta ve 128 kontrol grubu birey dahil edildi. Yapılan PZR-RFLP taraması sonucunda hasta grubunda heterozigot genotipinde 3, kontrol grubunda heterozigot genotipinde 1 *FLG* mutasyonu saptanmıştır. Ancak 2282del4 mutasyon sıklığı hem hasta hem de kontrol grubunda anlamlı değildir.

**Çizelge 3.3.** 2282del4 hasta ve kontrol grubu değerlendirmesi. (25 hasta, 8 kontrol grubu birey istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.)

	<b>Sadece Atopik Dermatitli Hastalar N= 41</b>	<b>Besin Alerjisine Atopik Dermatit Eşlik Eden Hastalar N= 263</b>	<b>Besin Alerjisine Atopik Dermatit Eşlik Etmeyen Hastalar N= 129</b>	<b>Sağlıklı Kontroller N= 120</b>
<b>Yaş* (yıl)</b>	1.5 (0.6-4.5)	1.0 (0.6-1.5)	2.0 (1.0-5.3)	2.4 (1.4-3.5)
<b>Cinsiyet (erkek) n,(%)</b>	27 (65.9)	184 (70.0)	85 (65.9)	70 (58.3)
<b>Eozinofil (%)*</b>	4.6 (2.8-7.8)	6.0 (3.4-9.2)	3.8 (2.4-7.2)	1.8 (1.2-2.9)
<b>Eozinofil sayısı* (/µl)</b>	400 (200-700)	600 (332.5-1100)	400 (200-699)	187 (100-300)
<b>Total IgE* (kU/L)</b>	29 (6.3-182)	83.0 (32.1-278.2)	97.3 (42.2-264.2)	10.5 (4.8-36.6)
<b>Astım n, (%)</b>	4 (9.8)	67 (25.5)	62 (48.1)	-
<b>Alerjik rinit n, (%)</b>	7 (17.1)	27 (10.3)	28 (21.7)	-

\*Medyan (çeyrekler arası aralık)

**Çizelge 3.4.** 2282del4 hasta ve kontrol grubu mutasyon sıklığı.

	<b>2282del4 mutasyon sıklığı %</b>	
	<b>Hasta grubu n: 433</b>	<b>Kontrol grubu n: 120</b>
<b>del yabanıl</b>	%99.3	%99.2
<b>del heterozigot</b>	%0.7	%0.8
<b>del homozigot</b>	%0	%0



### 3.4. Tartışma

*FLG* genindeki değişiklerin atopik dermatit ve diğer atopik hastalıklar için majör bir risk faktörü olduğu birçok çalışmayla doğrulanmıştır. *FLG* genindeki değişiklikler ilk kez 2006 yılında iktiyozis vulgaris’li hastalarda tanımlanmıştır [16]. Smith ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada iktiyozis vulgaris’li hastalarda fonksiyon kaybı ile sonuçlanan mutasyonlar olan (loss-of-function mutations) R501X ve 2282del4 mutasyonlarının; 3 İrlandalı, 3 İskoçyalı ve 1Avrupalı Amerikan ailelerde taranmasıyla, hastalık ve *FLG* mutasyonları arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir [17].

*FLG* mutasyonlarının atopik hastalıklarla ilişkisinin araştırılması amacıyla bugüne kadar pek çok popülasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ışığında, Asya ve Avrupa popülasyonlarına özgü 49 kesilme mutasyonu (truncating mutation) tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mutasyonlar tekrarlayan ve aileye özgü mutasyonlardır. Tekrarlayan mutasyonlar içerisinde Asya ve Avrupa popülasyonlarına özgü mutasyonlar da bulunmaktadır [15]. Tanımlanan *FLG* mutasyonları içerisinde R501X ve 2282del4 genetik değişikliklerinin Avrupa popülasyonunda en sık rastlanan mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğunda dahil edilen hasta gruplarında; atopik yürüyüş olarak isimlendirilen AD, besin alerjisi, alerjik rinit ve astımı içeren bir hastalık tablosu mevcut olduğundan, *FLG* mutasyonlarının etkisi hasta grubunda saptanmış olan atopik hastalıklar göz önünde bulundurularak gösterilmiştir.

Weidinger ve arkadaşlarının AD hikayesi bulunan 476 Alman ailesiyle yaptığı çalışmada; R501X mutasyonu ebeveynlerin %5.7’sinde, çocukların %8.82’sinde; 2282del4 mutasyonu ebeveynlerin %10,93’ünde, çocukların %15.76’sında; R501X/2282del4 toplam genotipi ise ebeveynlerin %16.02’sinde, çocukların %22.75’inde saptanmıştır. Yapılan bu çalışmayla *FLG* mutasyonlarının, özellikle yüksek IgE seviyesi ve alerjik duyarlılıkla eşlik eden ekstrinsik tip AD ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [101].

Palmer ve arkadaşları İrlanda’da 52 AD’li pediatrik hasta ve 189 kontrol grubundan oluşan çalışmada; R501X mutasyonu heterozigot sıklığını AD’li grupta %38.46, kontrol grubunda %6.35 olarak saptarken, homozigot genotipine her iki grupta da rastlanmamıştır. 2282del4 mutasyonu heterozigot sıklığı AD’li grupta %25, kontrol grubunda %2.15; homozigot sıklığı AD’li grupta %1.9 olarak saptanırken, kontrol grubunda rastlanmamıştır. R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde iki değişikliği heterozigot taşıyanların sıklığı AD’li grupta %44.23, kontrol grubunda %8.6, homozigot taşıyanların sıklığı AD’li

grupta %11.54 saptanırken kontrol grubunda rastlanmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 52 AD'li hastanın yaklaşık olarak yarısında astım bulunmaktaydı. Bu hastalar *FLG* genotipleri bakımında değerlendirildiğinde; heterozigot sıklığı %47.6, homozigot sıklığı %9.5 olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada İskoçya'lı 604 astımlı okul çağı çocuk-adolesan ve 1008 kontrol grubu dahil edilerek R501X mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot sıklığı astımlı grupta %8.77, kontrol grubunda %5.75; 2282del4 mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot sıklığı ise astımlı grupta %7.45, kontrol grubunda %3.77 olarak saptanmıştır. R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde heterozigot ve/veya homozigot sıklığı %22.94 olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada bu kez Danimarka'lı 372 çocuk dahil edilerek R501X mutasyonu sıklığı %5, 2282del4 mutasyonu sıklığı %7 ve R501X-2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde sıklık ~%11 olarak saptanmıştır. Atopik dermatiti bulunan 142 çocukta R501X-2282del4 birlikte değerlendirildiğinde, %17.6'sında mutant homozigot ve heterozigot genotipi görülmüştür. Hem AD'si hem de astımı bulunan çocuklarda ise R501X-2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde %19.2'sinde heterozigot genotipi bulunmuş, homozigot genotipine rastlanmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonlarının AD için güçlü bir genetik faktör olduğu, bu mutasyonların AD ile ilişkili astımla ilişkili olduğu ve R501X ve 2282del4 mutasyonlarının Avrupa popülasyonunun %9'unda görüldüğü gösterilmiştir [57].

Marenholz ve arkadaşları %79'u Alman, %8.2'si İtalyan, %9.6'sı İsveç, %2.2'si Hollanda'lı ve %1' Polonya'lı olan 490 Avrupalı aileyle (903 AD'li çocuk, %24.4 astım, %27.5 alerjik rinit, %15 alerjik rinit ve astım) yaptığı çalışmada; R501X mutasyonu allel frekansı %2.8, 2282del4 mutasyonu allel frekansı %6.6, R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde allel frekansı %9.3 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada 871 Alman kökenli çocuk (%21.7'si AD'li, %13.6'sı astımlı ve %14.1'i alerjik rinitli) ve 321 kontrol grubunun dahil edildiği çok merkezli alerji çalışması (MAS) yapılmış; R501X mutasyonu sıklığı AD'li grupta %9.6, kontrol grubunda %1.6; 2282del4 mutasyonu AD'li grupta %8, kontrol grubunda %3.5; R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde polimorfizm sıklığı AD'li grupta %16.7, kontrol grubunda %5.1 olarak saptanmıştır. Çok merkezli alerji çalışmasında (MAS); *FLG* mutasyonlarının görülme sıklığı kontrol grubunda %5.1, ekstrinsik tip AD'li grupta %17.1, astım ve AD'nin birlikte görüldüğü grupta %25, alerjik rinit ve AD'nin birlikte görüldüğü grupta %20.5 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada R501X ve 2282del4 *FLG*

mutasyonlarının AD patogenezinde ve atopik yürüyüşe ilerleyişte güçlü bir genetik faktör olduğu gösterilmiştir [102].

Barker ve arkadaşlarının İngiltere’de yaptığı çocukluk çağı başlangıçlı AD’si olan 163 yetişkin ve 1463 kontrol grubundan oluşan çalışmada; R501X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %25.8, kontrol grubunda %5.6; 2282del4 mutasyonu sıklığı AD’li grupta %20.9, kontrol grubunda %3.4; R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde polimorfizm sıklığı AD’li grupta %42.3, kontrol grubunda %8.8 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada R501X ve 2282del4 mutasyonlarının Avrupa popülasyonunda yüksek frekansta bulunduğu ve çocukluk çağı başlangıçlı AD’nin yetişkinlikte de yüksek oranlarda görüldüğü gösterilmiştir [103].

Hubiche ve arkadaşlarının AD’li 99 çocuk-yetişkin ve 102 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada R501X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %17.2; 2282del4 mutasyonu sıklığı AD’li grupta %15.2 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada Fransa popülasyonunda da R501X ve 2282del *FLG* mutasyonları AD ile ilişkili bulunmuştur [104].

Benedetto ve arkadaşlarının Londra ve Newcastle’da 186 yetişkin AD’li hasta ve 1035 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada; AD ile R501X, 2282del4, R2447X, S3247X, 3702delG ve 3673delC *FLG* mutasyonlarının ilişkisini araştırıldı. Çalışmada R501X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %25.8, kontrol grubunda %5.3; 2282del4 mutasyonu sıklığı AD’li grupta %19.4, kontrol grubunda %5.5; R2447X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %5.4, kontrol grubunda %0.8 olarak saptanmıştır. Bu 3 *FLG* mutasyonu erken başlangıçlı AD ile kuvvetli olarak ilişkili bulunmuştur. S3247X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %0.5, kontrol grubunda %0.5; 3702delG mutasyonu sıklığı AD’li grupta %0.5, kontrol grubunda %0.1; 3673delC mutasyonu sıklığı AD’li grupta %0.5 saptanırken, kontrol grubunda rastlanmamıştır. Bu nadir görülen 3 mutasyon, çalışmada AD ile ilişkili bulunmamıştır. 6 mutasyonun 1 ve/veya daha fazlasının mutasyon sıklığı AD’li grupta %45.7, kontrol grubunda %11.5 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmada *FLG* mutasyonlarının AD ile ilişkisi kanıtlanmış, incelenen popülasyonda sık ve nadir görülen mutasyonlar gösterilmiştir [105].

Greisenegger ve arkadaşlarının yaptığı 462 AD’li yetişkin hasta (274 Avusturyalı- 188 Alman, %28.1’i astımlı-%81.6’sı ekstrinsik tip AD’ye sahip) ve 402 kontrol grubundan oluşan çalışmada; R501X mutasyonu sıklığı AD’li grupta %6.5, kontrol grubunda %2.5; 2282del4 mutasyonu sıklığı AD’li grupta %14.7, kontrol grubunda %3.5; R2447X

mutasyonu sıklığı AD'li grupta %3, kontrol grubunda %1.5; S3247X mutasyonu sıklığı AD'li grupta %1.7, kontrol grubunda %0.3 olarak saptanmıştır. Bu 4 *FLG* mutasyonundan 1 ve/veya daha fazlasının sıklığı AD'li grupta %22,9, kontrol grubunda %7.7 olarak bulunmuştur. Çalışmada elde edilen veriler ışığında incelenen populasyonda sadece AD'nin patogeneğinde *FLG* mutasyonlarının güçlü etkisi kanıtlanmamış, aynı zamanda erken başlangıçlı AD gelişiminde *FLG* mutasyonlarının önemi de gösterilmiştir [106].

Bir diğer çalışmada Polonyalı 3802 hasta(çocuk-yetişkin), 1865 kontrol grubundan oluşan çalışmada; AD'li bireylerde R501X mutasyonu sıklığı %1.5, 2282del4 mutasyonu sıklığı %5.9; astımlı bireylerde R501X mutasyonu sıklığı %0.2, 2282del4 mutasyonu sıklığı %6; alerjik rinitli bireylerde R501X mutasyonu sıklığı %0.7, 2282del4 mutasyonu sıklığı %4.6 olarak saptanmıştır. R501X ve 2282del4 mutasyonları birlikte değerlendirildiğinde polimorfizm sıklığı AD'li bireylerde %7.4, astımlı bireylerde %6.3, alerjik rinitli bireylerde %5.3 olarak gösterilmiştir. Polonya populasyonunda diğer Avrupa populasyonlarına göre daha düşük mutasyon sıklıklarına ulaşılsa da, *FLG* mutasyonlarının AD ve AD ilişkili astım gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir [107].

Yapılan populasyon çalışmalarında özellikle AD ile *FLG* mutasyonlarının ilişkisi üzerinde durulmuş, ikincil olarak AD ile birlikte seyreden alerjik duyarlılık, alerjik rinit ve astım ilişkisinden bahsedilmiştir. Besin alerjisi ve AD de, atopik hastalık seyrinde birlikte görüldüğünden tek başına besin alerjisi ve *FLG* mutasyonlarının incelendiği çalışma bulunmamaktadır. Ancak hasta grubunda besin alerjisi bulunanları çalışmaya dahil edip, AD'yi besin alerjili grubun sahip olduğu ikincil hastalık olarak alan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda özellikle fındık alerjisi üzerinde durulmuştur.

Marenholz ve arkadaşlarının yaptığı Alman 871 kişiden oluşan çok merkezli alerji çalışma (MAS) kohortunda; 3 *FLG* mutasyonu genotiplemesi yapılarak, besin alerjisi, AD ve astım ilişkisi incelendi. Çalışmaya dahil edilen 871 kişinin %27.2'sinde AD (3 yaş öncesi başlangıçlı), %20.1'inde astım (13 yaşından sonra) ve %16.8'inde besin duyarlılığı (3 yaşlarında) bulunmaktaydı. *FLG* genotiplemesiyle R501X mutasyonu sıklığı %4.1, 2282del4 mutasyonu sıklığı %4.8, R2447X mutasyonu sıklığı %0.7 ve toplam *FLG* mutasyon sıklığı %9.4 olarak saptanmıştır. Çalışmada AD ve besin alerjenlerine duyarlılığı olan çocuklarda, *FLG* mutasyonları varlığının astım geliştirme riskinin %100 olduğu tahmin edilmiş ve AD'den astıma geçişte, *FLG* gen mutasyonlarıyla erken besin duyarlılık gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir [97].

249 Japon AD hastası ile yapılan bir çalışmada; 14 *FLG* mutasyonu ile 15 farklı alerjene karşı duyarlılık araştırıldı. Hastaların %25.7'sinde en az 1 *FLG* mutasyonu saptanırken, en yüksek *FLG* mutasyonu 3321delA (%8.4) ve K4671X (%10)'da görüldü. Hastaların %47.4'ünde ise en az 1 alerjene karşı duyarlılık tespit edildi. Ancak *FLG* mutasyonu taşıyan hastalarda yalnızca fıstık alerjisi saptanırken, diğer alerjenlerle ilişki bulunmadı [108].

Brown ve arkadaşları fıstık alerjisi olan 71 kişi (35 İngiliz, 20 Hollandalı, 16 İrlandalı) ve 1000 kontrol (İngiliz) ile yaptığı çalışmada R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonları ilişkisini araştırdı. Çalışmaya dahil edilen 71 hastanın % 74.1'inde, kontrol grubunun %27'sinde AD bulunmaktaydı. R501X ve 2282del4 mutasyonlarından en az birinin bulunma sıklığı hasta grubunda %16.9, kontrol grubunda %3.7 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada fıstık alerjisi olan 390 Kanada'lı hasta ve 891 Kanada'lı kontrol grubunda ile R501X, 2282del4, R2447X ve S3247X *FLG* mutasyonları çalışılmıştır. Araştırmaya dahil edilen 390 hastanın %69.5'inde AD bulunurken, kontrol grubunun AD %'si bilinmemektedir. R501X, 2282del4, R2447X ve S3247X *FLG* mutasyonlarından en az birinin bulunma sıklığı hasta grubunda %19.2, kontrol grubunda %11 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmayla *FLG* mutasyonlarının besin alerjilerinden fıstık alerjisiyle kuvvetli bir ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir [92].

Şaşırtıcı olarak R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonları Avrupada sık görülmesine karşın İtalyan popülasyonunda yapılan bir çalışmada bu mutasyonlar anlamlı bir değerde bulunmamıştır [61]. 178 İtalyan AD'li hasta ve 210 kontrol grubu ile yapılan çalışmada; R501X *FLG* mutasyonu allel sıklığı AD'li grupta %0.6 olarak saptanırken, kontrol grubunda rastlanmamıştır. 2282del4 *FLG* mutasyonu allel sıklığı AD'li grupta %0.9, kontrol grubunda %0.5 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonlarının İtalyanlarda AD ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Cascella ve arkadaşlarının İtalyan 220 AD'li hasta ve 201 kontrol grubu ile yaptığı *FLG* ekzon 3, 2 ve promotor bölge dizi analizi sonucunda 3 yeni *FLG* mutasyonu tanımlanmış, ancak saptanan yeni mutasyonlar da atopik dermatit ile ilişkili bulunmamıştır [109].

R501X ve 2282del4 mutasyonları sadece İtalyanlarda değil, Mısır ve Asya popülasyonlarında yapılan çalışmalarda da nadir olarak bulunmaktadır ya da hiç rastlanmamıştır. Asya popülasyonlarında yapılan çalışmalarla topluma özgü yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. Mohamed ve arkadaşlarının Mısırlı 99 AD'li hasta ve 75

kontrol grubuyla yaptığı çalışmada; R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonlarına AD'li hasta ve kontrol grubunda rastlanmamıştır [110]. Ching ve arkadaşlarının 174 AD'li hasta ve 191 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada; 2282del4, R2447X, S2554X ve S2889X *FLG* mutasyonlarına rastlanmazken, R501X *FLG* gen mutasyonu hasta grubundan 4 kişide saptanmıştır. Çin populasyonu ile yapılan bu çalışmada incelenen 5 mutasyon ile AD arasında ilişki bulunmamıştır [111]. Bir diğer çalışmada 137 AD'li hasta ve 134 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada 8 *FLG* mutasyonu (R501X, 3321delA, S1695, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X ve K4021X) incelenmiştir. Japon populasyonunda yapılan bu çalışmada incelenen 8 mutasyondan en az birini bulunduranların sıklığı %27 olarak saptanmış ve *FLG* mutasyonları AD ile ilişkili olarak bulunmuştur. Ancak bu populasyonda incelenen 8 mutasyon içerisinde olan R501X *FLG* gen mutasyonuna hasta ve kontrol grubunda rastlanmamıştır [112].

Bugüne kadar toplumumuzda *FLG* geni ve AD arasındaki ilişkiyi inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada 49 AD'li hasta ve 50 kontrol grubunda; *FLG* de R501X değişikliğine neden olan C/T tek nükleotid değişikliğinin AD ile ilişkisi incelenmiş ve hem hasta hem de kontrol grubunda R501X mutasyonu saptanmamıştır [113].

Bu tez çalışmasında filagrin genindeki değişiklikler ile AD ve besin alerjisi arasındaki ilişkiyi incelemek için beyaz Avrupa populasyonunda yaygın olarak bulunan R501X ve 2282del4 *FLG* mutasyonlarını inceledik. Çalışma grubunu oluşturan bireyler R501X *FLG* mutasyonu için 41 sadece AD'li, 259 hem besin alerjisi hem AD'si bulunan, 128 sadece besin alerjili hasta ve 128 kontrol bireyi içermekteydi, ancak hem hasta hem de kontrol grubunda R501X mutasyonu saptanmadı. Benzer şekilde 2282del4 *FLG* mutasyonu için 41 sadece AD'li, 263 hem besin alerjisi hem AD'si bulunan, 129 sadece besin alerjili hasta ve 120 kontrol grubu ile çalışıldı. Hasta grubunda heterozigot genotipinde 3, kontrol grubunda heterozigot genotipinde 1 *FLG* mutasyonu saptanmıştır. Ancak 2282del4 genotip sıklığı da R501X mutasyonu gibi hem hasta hem de kontrol grubunda anlamlı değildir.

Elde ettiğimiz veriler ışığında Türk toplumunda; atopik dermatit ve atopik yürüyüş olarak isimlendirilen besin alerjisi, alerjik rinit ve astımın da tabloya katıldığı hastalık seyrinde *FLG* mutasyonları ilişkili bulunmamıştır. Atopik hastalıklar ve *FLG* mutasyonlarının ilişkisinin toplumumuzda kesin olarak belirlenebilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Yaptığımız çalışma, bu konudaki araştırmamızın ilk basamağını oluşturmaktadır. Bundan sonra yapacağımız çalışmalarda Avrupa populasyonunda R501X ve 2282del4

*FLG* mutasyonları kadar sık görülmeselerde diğer mutasyonlara kıyasla daha çok karşılaşılan R2447X ve S3247X mutasyonlarıyla çalışmayı, ayrıca hasta grubumuza daha ağır seyreden besin alerjisi ve atopik dermatit hastalarını dahil etmeyi planlamaktayız.

R2447X ve S3247X değişikliklerine yol açan mutasyonların çalışılması sonucunda elde edilecek verilerin sonucuna bağlı olarak kendi toplumumuzda *FLG*'nin tümündeki genetik değişikliklerin frekansını saptamak ve bu değişikliklerin AD, besin alerjisi ile ilişkisini göstermek amacıyla yeni nesil sekanslama tekniği (next generation sequencing) kullanılarak *FLG*'nin dizilemesinin yapılması planlanmaktadır.

Epidermal bariyer disfonksiyonuyla ilişkili tüm atopik hastalıkların; genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin birbiriyle ilişkisiyle kompleks bir etiyolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu kompleks ilişki göz önünde bulundurularak, tüm toplumlarda *FLG* mutasyon taramaları tamamlandıktan sonra, immünoloji ve çevresel faktörleri de içeren toplumlar arası geniş taramalar yapılarak hastalığın ortaya çıkış ve ilerleyiş yolağı açığa çıkarılmalıdır. *FLG* mutasyonları çok yeni ortaya atılan bir konu olması sebebiyle atopik hastalıkların genetik ve immünolojik profilindeki yeri henüz tam olarak belirlenememiştir. Bu hastalıklarla ilgili yapılacak olan ileri çalışmalarla hastalıkların immünolojik ve genetik mekanizmaları tam olarak aydınlatılarak, *FLG* mutasyonlarının hastalık tablosundaki öneminin çok daha açık bir şekilde ortaya koyulacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Jamieson, M. Imagining 'reactivity': allergy within the history of immunology. *Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences*, 41, 356-366, **2010**.
- [2] MacLean, J.A., Eidelman, F.J. The genetics of atopy and atopic eczema. *Archives of dermatology*, 137, 1474-1476, **2001**.
- [3] Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F. ve diğ erleri. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113, 832-836, **2004**.
- [4] Bayram, A., Oymak, S., Gülmez, İ., Demir, R., Büyükoglan, H. Astımda Atopi ve Alerjik Rinit Sıklığı. *Erciyes Tıp Dergisi*, 32, 27-34, **2010**.
- [5] Ober, C., Yao, T.C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological reviews*, 242, 10-30, **2011**.
- [6] Kubo, A., Nagao, K., Amagai, M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *The Journal of clinical investigation*, 122, 440-447, **2012**.
- [7] Proksch, E., Folster-Holst, R., Brautigam, M., Sepehrmanesh, M., Pfeiffer, S., Jensen, J.M. Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 7, 1899-910, **2009**.
- [8] Kim, B.E., Leung, D.Y. Epidermal barrier in atopic dermatitis. *Allergy, asthma & immunology research*, 4, 12-16, **2012**.
- [9] Osawa, R., Akiyama, M., Shimizu, H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergology international*, 60, 1-9, **2011**.
- [10] Akiyama, M., Shimizu, H. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Experimental dermatology*, 17, 373-382, **2008**.
- [11] Oyoshi, M.K., He, R., Kumar, L., Yoon, J., Geha, R.S. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Advances in immunology*, 102, 135-226, **2009**.
- [12] Irvine, A.D., McLean, W.H. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 126, 1200-1202, **2006**.
- [13] O'Regan, G.M., Sandilands, A., McLean, W.H., Irvine, A.D. Filaggrin in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 122, 689-693, **2008**.



- [14] Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., McLean, W.H. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of cell science*, 122, 1285-1294, **2009**.
- [15] Irvine, A.D., McLean, W.H., Leung, D.Y. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *The New England journal of medicine*, 365, 1315-1327, **2011**.
- [16] McGrath, J.A. Profilaggrin, dry skin, and atopic dermatitis risk: size matters. *The Journal of investigative dermatology*, 132, 10-11, **2012**.
- [17] Smith, F.J., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L.E., Zhao, Y. ve diğ erleri. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature genetics*, 38, 337-342, **2006**.
- [18] Akdis, C.A., Akdis, M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P. ve diğ erleri. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 152-169, **2006**.
- [19] Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., Hamid, Q.A. New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*, 113, 651-657, **2004**.
- [20] Ott, H., Stanzel, S., Ocklenburg, C., Merk, H.F., Baron, J.M., Lehmann, S. Total serum IgE as a parameter to differentiate between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis in children. *Acta dermato-venereologica*, 89, 257-261, **2009**.
- [21] Tokura, Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*, 58, 1-7, **2010**.
- [22] Abramovits, W. Atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53, 86-93, **2005**.
- [23] Sehra, S., Tuana, F. M. B., Holbreich, M., Mousdicas, N., Kaplan, M. H., Travers, J. B. Clinical correlations of recent developments in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 83, 57-73, **2008**.
- [24] Bieber, T. Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*, 358, 1483-1494, **2008**.
- [25] Rodriguez, E., Baurecht, H., Herberich, E., Wagenpfeil, S., Brown, S.J., Cordell, H.J. ve diğ erleri. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123, 1361-1370, **2009**.
- [26] Bussmann, C., Weidinger, S., Novak, N. Genetics of atopic dermatitis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 9, 670-676, **2011**.

- [27] Worth, A., Sheikh, A. Food allergy and atopic eczema. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 10, 226-230, **2010**.
- [28] Bergmann, M.M., Caubet, J.C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P.A. Evaluation of food allergy in patients with atopic dermatitis. *The journal of allergy and clinical immunology in practice*, 1, 22-28, **2013**.
- [29] Burks, A.W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P.A., Ebisawa, M. ve diğeri. ICON: food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 129, 906-920, **2012**.
- [30] Wasserman, S., Watson, W. Food allergy. *Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 7, 7, **2011**.
- [31] Kim, J.S. Pediatric atopic dermatitis: the importance of food allergens. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 27, 156-160, **2008**.
- [32] Redlich, C.A. Skin exposure and asthma: is there a connection? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7, 134-137, **2010**.
- [33] Spergel, J.M. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Annals of allergy, asthma & immunology*, 105, 99-109, **2010**.
- [34] Zheng, T., Yu, J., Oh, M.H., Zhu, Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, asthma & immunology research*, 3, 67-73, **2011**.
- [35] Patrizi, A., Pileri, A., Bellini, F., Raone, B., Neri, I., Ricci, G. Atopic dermatitis and the atopic march: what is new? *Journal of allergy*, 2011, 279-425, **2011**.
- [36] Hsu, C.K., Akiyama, M., Shimizu, H. Filaggrin: an emerging star in atopic march. *Journal of the Formosan Medical Association*, 107, 429-431, **2008**.
- [37] Elias, P.M., Choi, E.H. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Experimental dermatology*, 14, 719-726, **2005**.
- [38] Wagner, H., Kostka, K.H., Lehr, C.M., Schaefer, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of controlled release*, 75, 283-295, **2001**.
- [39] McGrath, J.A., Uitto, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends in molecular medicine*, 14, 20-27, **2008**.
- [40] Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., Shimizu, A., Mizuno, H. ve diğeri. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *Journal of allergy and clinical immunology*, 129, 1538-1546, **2012**.
- [41] Elias, P.M. Skin barrier function. *Current allergy and asthma reports*, 8, 299-305, **2008**.

- [42] Cornelissen, L.H., Oomens, C.W., Huyghe, J.M., Baaijens, F.P. Mechanisms that play a role in the maintenance of the calcium gradient in the epidermis. *Skin research and technology*, 13, 369-376, **2007**.
- [43] Mao-Qiang, M., Mauro, T., Bench, G., Warren, R., Elias, P.M., Feingold, K.R. Calcium and potassium inhibit barrier recovery after disruption, independent of the type of insult in hairless mice. *Experimental dermatology*, 6, 36-40, **1997**.
- [44] Choi, E.H., Kim, M.J., Yeh, B.I., Ahn, S.K., Lee, S.H. Iontophoresis and sonophoresis stimulate epidermal cytokine expression at energies that do not provoke a barrier abnormality: lamellar body secretion and cytokine expression are linked to altered epidermal calcium levels. *The Journal of investigative dermatology*, 121, 1138-1144, **2003**.
- [45] Furukawa, F., Fujii, K., Horiguchi, Y., Matsuyoshi, N., Fujita, M., Toda, K. ve diğ erleri. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. *Microscopy research and technique*, 38, 343-352, **1997**.
- [46] Hachem, J.P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *The Journal of investigative dermatology*, 121, 345-353, **2003**.
- [47] Darlenski, R., Kazandjieva, J., Tsankov, N. Skin Barrier Function: Morphological Basis and Regulatory Mechanism. *Journal of Clinical Medicine*, 4, 36-45, **2011**.
- [48] Fluhr, J.W., Darlenski, R., Angelova-Fischer, I., Tsankov, N., Basketter, D. Skin Irritation and Sensitization: Mechanisms and New Approaches for Risk Assessment. *Skin Pharmacol Physiol*, 21, 124–135, **2008**.
- [49] Madison, K.C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 121, 231-241, **2003**.
- [50] Scott, I.R., Harding, C.R. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Developmental biology*, 115, 84-92, **1986**.
- [51] Steinert, P.M., Cantieri, J.S., Teller, D.C., Lonsdale-Eccles, J.D., Dale, B.A. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 4097-4101, **1981**.
- [52] Markova, N.G., Marekov, L.N., Chipev, C.C., Gan, S.Q., Idler, W.W., Steinert, P.M. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 13, 613-625, **1993**.
- [53] Brown, S.J., McLean, W.H. One remarkable molecule: filaggrin. *The Journal of investigative dermatology*, 132, 751-762, **2012**.

- [54] Lonsdale-Eccles, J.D., Teller, D.C., Dale, B.A. Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin. *Biochemistry*, 21, 5940-5948, **1982**.
- [55] Kam, E., Resing, K.A., Lim, S.K., Dale, B.A. Identification of rat epidermal profilaggrin phosphatase as a member of the protein phosphatase 2A family. *Journal of cell science*, 106, 219-226, **1993**.
- [56] O'Regan, G.M., Irvine, A.D. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40, 965-972, **2010**.
- [57] Palmer, C.N., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P. ve diğeri. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*, 38, 441-446, **2006**.
- [58] Tarcsa, E., Marekov, L.N., Mei, G., Melino, G., Lee, S.C., Steinert, P.M. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *The Journal of biological chemistry*, 271, 30709-30716, **1996**.
- [59] Brown, S.J., Irvine, A.D. Atopic eczema and the filaggrin story. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 27, 128-137, **2008**.
- [60] Chen, H., Common, J.E., Haines, R.L., Balakrishnan, A., Brown, S.J., Goh, C.S. ve diğeri. Wide spectrum of filaggrin-null mutations in atopic dermatitis highlights differences between Singaporean Chinese and European populations. *The British journal of dermatology*, 165, 106-114, **2011**.
- [61] Giardina, E., Paolillo, N., Sinibaldi, C., Novelli, G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology*, 216, 83-84, **2008**.
- [62] Winge, M.C., Bilcha, K.D., Lieden, A., Shibeshi, D., Sandilands, A., Wahlgren, C.F. ve diğeri. Novel filaggrin mutation but no other loss-of-function variants found in Ethiopian patients with atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*, 165, 1074-1080, **2011**.
- [63] Sandilands, A., Terron-Kwiatkowski, A., Hull, P.R., O'Regan, G.M., Clayton, T.H., Watson, R.M. ve diğeri. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nature genetics*, 39, 650-654, **2007**.
- [64] O'Regan, G.M., Sandilands, A., McLean, W.H., Irvine, A.D. Filaggrin in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124, 2-6, **2009**.
- [65] McGrath, J.A. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *The Australasian journal of dermatology*, 49, 64-73, **2008**.

- [66] Furue, M., Chiba, T., Takeuchi, S. Current status of atopic dermatitis in Japan. *Asia Pacific allergy*, 1, 64-72, **2011**.
- [67] Wuthrich, B. [Atopic dermatitis]. *Therapeutische Umschau Revue therapeutique*, 46, 633-640, **1989**.
- [68] Brenninkmeijer, E.E., Spuls, P.I., Legierse, C.M., Lindeboom, R., Smitt, J.H., Bos, J.D. Clinical differences between atopic and atopiform dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58, 407-414, **2008**.
- [69] Oranje, A.P., Glazenburg, E.J., Wolkerstorfer, A., de Waard-van der Spek, F.B. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *The British journal of dermatology*, 157, 645-648, **2007**.
- [70] Williams, H., Flohr, C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 209-213, **2006**.
- [71] Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Nickel, R., Gruber, C., Niggemann, B. ve diğerleri. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113, 925-931, **2004**.
- [72] Novak, N., Bieber, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112, 252-262, **2003**.
- [73] Civelek, E., Cakir, B., Boz, A.B., Yuksel, H., Orhan, F., Uner, A. ve diğerleri. Extent and burden of allergic diseases in elementary schoolchildren: a national multicenter study. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 20, 280-288, **2010**.
- [74] Akiyama, M. FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *The British journal of dermatology*, 162, 472-477, **2010**.
- [75] Boguniewicz, M., Leung, D.Y. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological reviews*, 242, 233-246, **2011**.
- [76] Barnes, K.C. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125, 16-29, **2010**.
- [77] Gao, P.S., Rafaels, N.M., Hand, T., Murray, T., Boguniewicz, M., Hata, T. ve diğerleri. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124, 507-513, 513 e501-507, **2009**.
- [78] Leung, D.Y. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergology international*, 62, 151-161, **2013**.

- [79] Kuo, I.H., Yoshida, T., De Benedetto, A., Beck, L.A. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131, 266-278, **2013**.
- [80] Wolf, R., Wolf, D. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinics in dermatology*, 30, 329-334, **2012**.
- [81] Chafen, J.J., Newberry, S.J., Riedl, M.A., Bravata, D.M., Maglione, M., Suttorp, M.J. ve diğerleri. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *The journal of the American Medical Association*, 303, 1848-1856, **2010**.
- [82] Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A. ve diğerleri. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126, 1105-1118, **2010**.
- [83] Beyer, K., Teuber, S. The mechanism of food allergy: what do we know today? *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 4, 197-199, **2004**.
- [84] Holloway, E., Fox, A., Fitzsimons, R. Diagnosing and managing food allergy in children. *Practitioner*, 255, 19-22, **2011**.
- [85] Mukoyama, T., Nishima, S., Arita, M., Ito, S., Urisu, A., Ebisawa, M. ve diğerleri. Guidelines for diagnosis and management of pediatric food allergy in Japan. *Allergology international*, 56, 349-361, **2007**.
- [86] Suh, K.Y. Food allergy and atopic dermatitis: separating fact from fiction. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 29, 72-78, **2010**.
- [87] Filipiak-Pittroff, B., Schnopp, C., Berdel, D., Naumann, A., Sedlmeier, S., Onken, A. ve diğerleri. Predictive value of food sensitization and filaggrin mutations in children with eczema. *Journal of allergy and clinical immunology*, 128, 1235-1241, **2011**.
- [88] Rance, F., Boguniewicz, M., Lau, S. New visions for atopic eczema: an iPAC summary and future trends. *European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 19, 17-25, **2008**.
- [89] Han, Y., Kim, J., Ahn, K. Food allergy. *Korean journal of pediatrics*, 55, 153-158, **2012**.
- [90] Hill, D.J., Hosking, C.S., de Benedictis, F.M., Oranje, A.P., Diepgen, T.L., Bauchau, V. ve diğerleri. Confirmation of the association between high levels of immunoglobulin E food sensitization and eczema in infancy: an international study. *Clinical and experimental allergy*, 38, 161-168, **2008**.
- [91] Leung, D.Y. Our evolving understanding of the functional role of filaggrin in atopic dermatitis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 124, 494-495, **2009**.

- [92] Brown, S.J., Asai, Y., Cordell, H.J., Campbell, L.E., Zhao, Y., Liao, H. ve diğerleri. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127, 661-667, **2011**.
- [93] Matsumoto, K., Saito, H. Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases - per-"eczema"tous sensitization drives the allergy march. *Allergology international*, 62, 291-296, **2013**.
- [94] Lack, G. Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121, 1331-1336, **2008**.
- [95] Werfel, T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 129, 1878-1891, **2009**.
- [96] Spergel, J.M., Paller, A.S. Atopic dermatitis and the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112, 118-127, **2003**.
- [97] Marenholz, I., Kerscher, T., Bauerfeind, A., Esparza-Gordillo, J., Nickel, R., Keil, T. ve diğerleri. An interaction between filaggrin mutations and early food sensitization improves the prediction of childhood asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 123, 911-916, **2009**.
- [98] Sehra, S., Tuana, F. M. B., Holbreich, M., Mousdicas, N., Kaplan, M. H., Travers, J. B. Clinical correlations of recent developments in the pathogenesis of atopic dermatitis *Anais Brasileiros de Dermatologia* 83, 57-73, **2008**.
- [99] Ying, S., Meng, Q., Corrigan, C.J., Lee, T.H. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 1386-1388, **2006**.
- [100] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. ve diğerleri. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491, **1988**.
- [101] Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H., Irvine, A.D., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A. ve diğerleri. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 214-219, **2006**.
- [102] Marenholz, I., Nickel, R., Ruschendorf, F., Schulz, F., Esparza-Gordillo, J., Kerscher, T. ve diğerleri. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 866-871, **2006**.
- [103] Barker, J.N., Palmer, C.N., Zhao, Y., Liao, H., Hull, P.R., Lee, S.P. ve diğerleri. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *The Journal of investigative dermatology*, 127, 564-567, **2007**.

- [104] Hubiche, T., Ged, C., Benard, A., Leaute-Labreze, C., McElreavey, K., de Verneuil, H. ve diğeri. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta dermato-venereologica*, 87, 499-505, **2007**.
- [105] Brown, S.J., Sandilands, A., Zhao, Y., Liao, H., Relton, C.L., Meggitt, S.J. ve diğeri. Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema. *The Journal of investigative dermatology* 128, 1591-1594, **2008**.
- [106] Greisenegger, E., Novak, N., Maintz, L., Bieber, T., Zimprich, F., Haubenberger, D. ve diğeri. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24, 607-610, **2010**.
- [107] Poninska, J., Samolinski, B., Tomaszewska, A., Raciborski, F., Samel-Kowalik, P., Walkiewicz, A. ve diğeri. Filaggrin gene defects are independent risk factors for atopic asthma in a Polish population: a study in ECAP cohort. *PLoS One*, 6, 16933, **2011**.
- [108] Li, M., Liu, J.B., Liu, Q., Yao, M., Cheng, R., Xue, H. ve diğeri. Interactions between FLG mutations and allergens in atopic dermatitis. *Archives of dermatological research*, 304, 787-793, **2012**.
- [109] Cascella, R., Foti Cuzzola, V., Lepre, T., Galli, E., Moschese, V., Chini, L. ve diğeri. Full sequencing of the FLG gene in Italian patients with atopic eczema: evidence of new mutations, but lack of an association. *The Journal of investigative dermatology*, 131, 982-984, **2011**.
- [110] Mohamed, N.S., Hashad, D. I. Filaggrin Gene Polymorphisms in Egyptian Atopic Dermatitis Patients. *Journal of the Medical Research Institute*, 31, 19-23, **2010**.
- [111] Ching, G.K., Hon, K.L., Ng, P.C., Leung, T.F. Filaggrin null mutations in childhood atopic dermatitis among the Chinese. *International journal of immunogenetics*, 36, 251-254, **2009**.
- [112] Nemoto-Hasebe, I., Akiyama, M., Nomura, T., Sandilands, A., McLean, W.H., Shimizu, H. FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema. *The British journal of dermatology*, 161, 1387-1390 **2009**.
- [113] Ercan, H., Ispir, T., Kirac, D., Baris, S., Ozen, A., Oztezcan, S. ve diğeri. Predictors of atopic dermatitis phenotypes and severity: roles of serum immunoglobulins and filaggrin gene mutation R501X. *Allergol Immunopathol*, 41, 86-93, **2013**.



# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: NEŞE VARDAR

Doğum Yeri: BURSA

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: nesevardar@yahoo.com

Adresi: Birlik Mah. Akın Sok. 15/11 ÇANKAYA/ANKARA

## Eğitim

Lise: Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi / BURSA

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Yandal Eğitimi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Advanced (ileri)

## İş Deneyimi (-)

### Deneyim Alanları

Moleküler genetik, genetik polimorfizm, biyokimya, kanser biyolojisi

## Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.(Proje no: 012DO6601002) Proje Bütçesi: 15.578 TL"dir.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

### Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Neşe Vardar, Çağatay Karaaslan, Özlem Cavkaytar, Ebru Arık Yılmaz, Betül Büyüktiryaki, Cansın Saçkesen, Türk Çocuklarında Filagrin Genindeki Değişikliklerin Atopik Dermatit ve Besin Allerjisi ile İlişkisi, XX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 2-6 Kasım 2013, Antalya, **Deri Allerjileri-1 Kategorisinde Poster Birincilik Ödülü**

# EKLER

## Ek-1

### Etik Kurul İzni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1062 - Faks: 0 (312) 310 0580  
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00

257

04 Mart

#### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 13.02.2013 ÇARŞAMBA  
**Toplantı No** : 2013/03  
**Proje No** : C/O 13/100 (Değerlendirme Tarihi 13.02.2013)  
**Karar No** : GO 13/100 - 20

Üniversitemiz Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, araştırma görevlisi Dr. İ. Çağatay Karaaslan sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Ayfer Tuncer, Prof. Dr. Erol Aksöz, Prof. Dr. Cansın Saçkesen ve Uzm. Dr. Özlem Cavkaytar ile birlikte çalışacakları Neşe Vardar'ın tezi olan GO 13/100 kayıt numaralı ve "**Filagrin Gen Polimorfizmlerinin Besin Allerjisi ve Atopik Dermatit ile İlişkisinin Araştırılması**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nuriye Akarsu (Başkan) 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye)

İZİNLİ  
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) 10. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)

3. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) 11. Doç. Dr. M. Çiğdem Sara (Üye)

4. Prof. Dr. Sevda F. Mafitöglü (Üye) 12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)

5. Prof. Dr. Cenk Sökmenster (Üye) İZİNLİ  
13. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)

6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) KATILMADI  
14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Turnagöl (Üye)

7. Prof. Dr. Songül Varzoğlu (Üye) 15. Av. Meltem Onurlu (Üye)

8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye)

Ek-1

Poster Ödülü

# XX ULUSAL ALLERJİ & KLİNİK İMMÜNOLÖJİ KONGRESİ

ANTALYA  
2013

02 - 06 KASIM | GLORIA RESORT  
BELEK -ANTALYA

Kongre  
Düzenleme Kurulu

Kongre Başkanı  
Prof. Dr. Ömer Kalaycı  
Prof. Dr. Bülent Şekerel

Bilimsel Kurul Başkanı  
Prof. Dr. Feyzullah Çeltikçaya

Kongre Sekreteri  
Prof. Dr. Cansın Saçkesen

AİD Yürütüm Kurulu

Başkan  
Prof. Dr. Zeynep Mısırlıoğlu

2. Başkan  
Prof. Dr. Ayfer Tuncer

Başkan Yardımcısı  
Prof. Dr. Sema Büyükköleç

Genel Sekreter  
Prof. Dr. Bülent E. Şekerel

Mali Sekreter(Sayınan)  
Prof. Dr. Gül Karakaya

Öyeler  
Prof. Dr. V. Dilpad Mengon  
(Eylül-Şubat)  
Prof. Dr. Feyzullah Çeltikçaya  
(Mart-Sunul)

YAZIŞMA ADRESİ

Yeni Sıpaht (AİD Sekreteri)  
Mevlata Kemal Mh. 2104 Sk.  
No:15/3-4 Sığırtıtl.  
Çankaya / Ankara  
Tel : 0312 219 66 31  
e-posta: sekreter@aiid.org.tr

ORGANİZASYON SEKRETERYASI

FIGÜR KONGRE ORGANİZASYON  
SERVİSLERİ LTD. ŞTİ.  
19 Mayıs Mh. 19 Mayıs Cad.  
Nova Baran Plaza No. 4 Kat:5  
34380 Şişli - İstanbul  
Tel : 0 212 381 46 00  
Faks : 0 212 238 60 78  
e-posta : allerji@figur.net

02 - 06 Kasım 2013 tarihleri arasında Antalya, Gloria Golf Resort Otel ' de düzenlenen "XX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi" nde olarak sunduğunuz;

[P-077]Türk Çocuklarında Filagrin Genindeki Değişikliklerin Atopik Dermatit ve Besin Allerjisi ile İlişkisi

Neşe Vardar<sup>1</sup>, Çağatay Karaaslan<sup>1</sup>, Özlem Cavkaytar<sup>2</sup>, Ebru Anık Yılmaz<sup>2</sup>, Betül Büyüktiryak<sup>1</sup>, Cansın Saçkesen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D., Ankara

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Allerji Bilim Dalı, Ankara

başlıklı bildiri ile "Deri Allerjileri-1" kategorisinde sunulan posterler arasından birincilik ödülünü kazandınız.

Tebrik eder, başarılarınızın devamını dileriz.

Prof. Dr. C. Ömer Kalaycı  
Kongre Başkanı

Prof. Dr. Bülent E. Şekerel  
Kongre Başkanı

Prof. Dr. Zeynep Mısırlıoğlu  
Türkiye Ulusal Allerji ve  
Klinik İmmünoloji Demeki  
Başkanı

