

Alopesi Areata'da *IL-17* Promotör Polimorfizminin (-152 G/A) Araştırılması
Investigation of *IL-17* promoter polymorphism (-152 G/A) in alopecia areata

**Nihan Bozkurt¹, Sümeyye Deniz Çelik¹, Ömer Ateş¹, Saime Sezer Sondaş¹, Emel Ensari¹,
Göknur Kalkan²**

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji A.D, Ankara

Sorumlu Yazar

Dr. Öğr. Üye. Nihan Bozkurt

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D,

Kaleardı Mahallesi Muhittin Fisunoğlu Caddesi Ali Şevki Erek Yerleşkesi 60100, Merkez/TOKAT

E-mail:nihan.bozkurt@gmail.com

Özet

Amaç: T- hücre aracılı otoimmün bir hastalık olan Alopesi areata (AA)'nın patogenezinde T helper 17 hücreleri (Th17) önemli bir rol oynamaktadır. Önceki çalışmalar AA'lı hastalarda, Th17 hücreleri tarafından üretilen interlökin (*IL*)-17'nin ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı *IL-17* -152 G/A promotör polimorfizmi ile AA'nın ilişkisinin olup olmadığını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Sunulan bu çalışmada, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Enzim Analizi (REA) yöntemleri kullanılarak 188 AA hastasında ve 168 sağlıklı bireyde *IL-17* geni -152 G/A polimorfizminin genotip ve allel dağılımı analiz edildi.

Bulgular: Hasta ve kontrol grupları arasında *IL-17* geni -152 G/A promotör polimorfizminin genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p=0.0300$). Ancak *IL-17* -152 G/A polimorfizminin allel frekanslarının dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.160$).

Sonuç: Bizim sonuçlarımız, *IL-17* -152G/A promotör polimorfizminin AA ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alopesi areata, *IL-17*, Otoimmünite, Polimorfizm

Abstract

Objectives: T helper 17 cells (Th17) play an important role in the pathogenesis of Alopecia areata (AA), which is a T-cell mediated autoimmune disease. Previous studies showed significantly increased expression of interleukin (*IL*)–17, which product from Th17 cells, levels in AA patients compared to healthy controls. The aim of present study was to assess whether *IL*–17 -152 G/A promoter polymorphism is associated with AA.

Material and Methods: The present study analyzed the genotype distribution and allele frequency for the *IL*–17 -152 G/A promoter polymorphism using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique in 188 AA patients and 168 healthy individuals.

Results: Genotype distribution of the *IL*–17 -152 G/A polymorphism was found to be significantly different between patients and controls ($p=0.0300$). However allele frequencies of the *IL*–17 -152 G/A polymorphism were not found to be significantly different between patients and controls ($p=0.160$).

Conclusion: Our results suggested that promoter region polymorphism -152G/A of *IL*–17 gene was associated with AA.

Keywords: Alopecia Areata, Autoimmunity, *IL*–17, Polymorphism

Giriş

Alopesi areata (AA), T hücrelerinin kıl foliküllerine zarar vermesi sonucunda skarsız, inflamatuvar ve çeşitli derecelerdeki kıl dökülmeleriyle karakterize edilen otoimmün özellikte bir deri hastalığıdır (1, 2, 3). AA'nın klinikte iki ciddi formundan biri olan alopesi totalis, saçlı derideki kılların tamamının dökülmesi, alopesi universalis ise vücuttaki tüm kılların dökülmesiyle tanımlanmaktadır (4). AA, anagen aşamadaki kıl foliküllerinin etrafında birincil olarak lenfosit, monosit, mast hücreleri ve langerhans hücreleri içeren perifoliküler lenfotik infiltrasyonlardan oluşan histopatolojik özellikler göstermektedir. Hastalığın patogeneğinde T lenfositleri önemli bir rol oynamakta ve CD4⁺T hücrelerinin yardımıyla CD8⁺T hücreleri efektör hücreleri etkilemektedir (5). AA'nın patogeneğinde T lenfositlerinden üretilen sitokinlerin rolü yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Happel ve Hoffmann tarafından interleukin (*IL*)–1 β , interferon-gamma (*IFN*- γ), *IL*–2 ve *IL*–10'un hastalığın patogeneğine dahil olduğu gösterilmiştir (6).

IL–17, majör olarak T helper 17 hücreleri (Th17) tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokindir (7). *IL*–17 geni ilk olarak sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 8 (*CTLA8*) olarak keşfedilmiştir. Alerjiler, enfeksiyonlar, doku yaralanmaları ve metabolik hastalıklar gibi irritasyon uyarıcılarına yanıt olarak çeşitli tipteki immün hücrelerden salgılanmaktadır (8). *IL*–17, proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, hücre adhezyon moleküllerinin ve büyüme faktörlerinin üretimine dahil olmaktadır (9). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *IL*–

17'nin CD4⁺ ve CD8⁺T lenfositleriyle birlikte AA'nın patogeneğinde önemli role sahip olduğu bilinen tümör nekroz faktör (TNF) α ve IFN- γ sitokinlerinin üretimini uyardığı bildirilmiştir (10). IL-17 otoimmün hastalıklarda patojenik bir role sahip olmakla birlikte astım ve sistemik lupus eritematozus gibi bazı otoimmün hastalıklarda ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (7,9). Yapılan çalışmalarda AA'lı hastaların serum ve doku örneklerinde IL-17'nin seviyesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu rapor edilmiştir (11,12). Literatür bilgilerimize göre, AA'da IL-17 ve onun reseptörü olan IL17RA genindeki polimorfizmlerinin incelendiği bir kaç tane çalışma mevcuttur.

IL-17'nin inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı (7), bu gendeki çeşitli polimorfizmlerin AA ile ilişkili olduğu (9) ve AA hastalarında IL-17'nin serum seviyesinin daha yüksek olduğu (12) bilinmektedir. Bu nedenlerle IL-17 -152G/A polimorfizmi ile AA arasındaki bağlantının araştırılması önemli olacaktır. Bu çalışma; IL-17 geni -152G/A promotör polimorfizminin Alopesi areata ile olası ilişkisinin toplumumuzda değerlendirilebilmesi amacıyla gerçekleştirildi.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Ana Bilim Dalı polikliniğine başvuran 18-45 yaş arası Alopesi areata tanısı konulmuş 188 hasta (yaş ortalaması \pm SD: 32.31 \pm 7.453 yıl) ve kendisinde ve akrabalarında AA olmayan 168 bireyden oluşan kontrol

grubu (yaş ortalaması \pm SD: 33.25 \pm 6.417) dahil edilmiştir. Hasta grubunun 92'sini erkek ve 96'sını kadın, kontrol grubunun ise 80'nini erkek ve 88'ini kadın hasta oluşturmaktadır. Kontrol grubundaki kişiler AA öyküsü olmayan ve dermatoloji kliniğine diğer sebeplerden başvuran hastalardan seçildi. Yapılan çalışmaya Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Etik Kurulu tarafından onay alınmış olup araştırmaya katılan her birey ayrıntılı olarak bilgilendirilmiş ve onam formu alınmıştır.

IL-17 geni -152 G/A polimorfizminin Genotiplendirilmesi

Çalışma gruplarından her bir hasta için 2 ml periferik kan örneği EDTA'lı tüp içerisinde alındı. Genomik DNA izolasyonu, PureLink™ genomik DNA pürifikasyon kiti (Invitrogene) protokolüne uygun olarak yapıldı. Bu çalışmada IL-17 geni -152 G/A polimorfizminin allel ve genotip dağılımı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Enzim Analizi (REA) yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Çalışmada kullanılan primerler, restriksiyon enzimi ve PZR-REA şartları için Chen ve ark.'larının (7) yaptıkları çalışma referans alındı. IL-17 geni -152 G/A polimorfizminin amplifikasyonunda kullanılan primerler, kesim enzimi, PZR ürün boyu, kesim ürünlerinin boyları ve PZR şartları Tablo 1 de gösterildi. IL-17 geni -152 G/A bölgesinin amplifikasyonu için son hacim 25 μ L olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına, 50 ng genomik DNA, 0.8 nmol/ μ l her bir primer, 10X PCR 2.5 mM Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP ve 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas) eklendi. Elde edilen PZR

ürünleri REA yöntemleri kullanılarak analiz edildi. PZR ürünleri 1 U Xmn I restriksiyon enzimi (Thermo Scientific,USA) ile 37 °C' de bir saat bekletilerek kesildi. Kesim ürünleri etidyum bromür ile boyanmış % 2'lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra

UV ışık altında incelendi. *IL-17* geni -152 G alleli içeren PZR ürünleri Xmn I restriksiyon enzimi ile kesildiğinde 344 baz çiftlik tek bant oluşurken -152 A alleli içeren PZR ürünleri Xmn I enzimi ile kesildiğinde 213 ve 131 baz çiftlik 2 bant şeklinde gözlemlendi.

Tablo 1. *IL-17* -152 G/A Polimorfizmi için primer dizisi, kesim enzimi, ürün boyları, PZR programı

Polimorfizm	Primer Dizisi	Ürün Boyu	Kesim Enzimi	Kesim Ürünlerinin Boyu	PZR Programı
IL-17-152 G/A	5'- CAGAAGACCTACATGTTACT- 3' 5'-GTAGCGCTATCGTCTCTCT- 3''	344 bç	Xmn I	G; 344 bç A; 213+131 bç	95°C 5 dk. 94°C 30 sn. 58.5°C 32sikus 72°C 30sn. 72°C 5dk. } 40sn.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 13.0 ve OpenEpi Info 2.3.1 (www.openepi.com) yazılım programları kullanıldı. AA hasta ve kontrol gruplarında *IL-17* geni -152 G/A gen polimorfizminin genotip dağılımı χ^2 , allel dağılımı ise Fisher kesin χ^2 testleri ile karşılaştırıldı. *p* değeri 0.05'den küçük bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken genotip dağılımı ve Hardy-Weinberg (HWE) denkliği için <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> programı kullanıldı.

Bulgular

IL-17 geninin promotör bölgesinde bulunan -152 G/A gen polimorfizminin genotip ve allel dağılımı hasta ve kontrol gruplarında analiz edildi. Çalışma gruplarına ait demografik özellikler tablo 2'de verildi ve çalışma grupları arasında

cinsiyet ve yaş dağılımı yönünden anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla, $p=0.8322$ ve $p=0.205$). *IL-17* geni -152 G/A promotör polimorfizminin genotip dağılımının hasta ve kontrol grubunda HWE denkliğine uygun olduğu bulundu. AA'lı hasta ve kontrol grubunda, *IL-17* geni -152 G/A polimorfizminin genotip dağılımı ve allel sıklığı Tablo 3'de verildi. Hasta ve kontrol grupları arasında *IL-17* geni -152 G/A promotör polimorfizminin genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p=0.0300$). *IL-17* -152 G/A polimorfizminin allel frekanslarının dağılımı ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.160$). AA genotipinin GG+GA genotiplerine oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunurken AA+AG' nin GG genotipine oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla, $p=0.007$, OR 0.35, 95 % CI 0.14- 0.81; $p=0.472$).

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	AA hasta grubu (N=188)	Kontrol grubu (N=168)	P
Cinsiyet			
Kadın	96 (%51)	88 (%52)	0.8322
Erkek	92 (%49)	80 (%48)	
Yaş			
Yaş ortalaması (yıl)	32.31 ± 7.453	33.25 ± 6.417	0.205

Tablo 3. IL-17 -152 G/A Polimorfizminin AA Hastalarında ve Kontrol Grubundaki Genotip Dağılımı ve Allel Sıklığı

	AA hasta grubu N=188(%)	Kontrol N=168(%)	Grubu P	O.R (CI 95%)
IL-17 -152 G/A				
Genotipler			0.0300	
GG	100(53%)	90 (54%)		
AG	80(43%)	59 (35%)		
AA	8(4%)	19 (11%)		
AA: GG+AG	8:180	19:149	0.007	0.35(0.14 - 0.81)
GG: AA+AG	100:88	90:78	0.472	
Alleller			0.160	
G	280(74%)	239(71%)		
A	96(26%)	97(29%)		

Tartışma

AA, genetik yatkınlık ve çevresel bir tetikleyicilerle birlikte organa spesifik otoimmün bir hastalıktır (13). AA, en yaygın otoimmün hastalıklardan biri olmasına rağmen kronik kıl kaybının patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir ve mevcut tedavi yöntemleri umut vadetmemektedir. Daha önceki çalışmalar AA'nın patogenezi sitokinlerin ve değişmiş T hücre aracılı bağışıklığın rolü olduğunu göstermektedir (10).

Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-17'nin üretimi ile karakterize edilen Th17 hücreleri AA'nın da dahil olduğu otoimmün hastalıkların patogenezi kritik bir rol oynamaktadır. Tojo ve ark.'ları yaptıkları çalışmada IL-17 üreten hücrelerin kıl folikülü etrafında baskın olarak infiltrate olduğunu rapor etmişlerdir (11). Alli ve ark.'ları alopesi universalis'li bir deney hayvanı üzerinde yaptıkları çalışmada hastalığın erken aşamasında patolojik T hücrelerinin

birincil olarak IFN- γ ve IL-17'yi eksprese ettiğini göstermişlerdir (14). AA lezyonları, kıl folikülleri etrafında yoğun bir lenfotik infiltrasyonla karakterize edilmektedir ve daha önceki çalışmalarda IL-17 salgılayan hücrelerin foliküler dejenerasyona daha yoğun bir şekilde katıldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde immünofloresan boyama ile AA lezyonları içinde özellikle kıl folikülü etrafında Th17 hücreleri belirlendi. Han ve ark.'ları ise yaptıkları çalışmada, lezyonlardaki IL-17⁺ lenfositlerin seviyesi ile dolaşımdaki Th17 hücrelerinin seviyesinin pozitif olarak ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (4). Atwa ve ark.'ları yaptıkları çalışmada AA'lı hastalarda IL-6, IL-17, IL-21, IL-22 ve TNF α sitokinlerinin serum seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda IL-17 ve TNF α sitokinlerinin seviyesi ile hastalık şiddeti arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur (12). Bu raporlar IL-17'nin AA gelişimi üzerinde katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Literatür bilgilerimize göre, dokuya özgü otoimmün bir hastalık olan AA'da IL-17 genindeki çeşitli polimorfizmlerinin incelendiği bir kaç tane çalışma bulunmaktadır. Lew ve ark.'ları, Kore toplumunda yaptıkları çalışmada IL17 ve onun reseptörü olan IL17RA genindeki polimorfizmler ile AA arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonuçları incelendiğinde IL17 (rs2275913, rs3819024) polimorfizmleri ile AA arasında bir ilişki bulunmamıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında IL17RA (rs879577) polimorfizmi anlamlı derecede farklı bulunurken IL17RA (rs4819554) polimorfizmi ile hastalığın başlangıç yaşı arasında önemli bir fark bulunmuştur (13). Aytakin ve ark.'ları, Türk toplumunda

IL17, IL12 ve IL23R genlerindeki polimorfizmler ile AA arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucunda IL12 (1188A/C) ve IL23R (+2199A/C) gen polimorfizimleri ile AA arasında bir ilişki bulunmazken IL17 (A7488G) GG genotipi AA'ya yatkınlıkla GA genotipi ise hastalıktan koruyuculukla ilişkilendirilmiştir (9).

Çalışmamızda IL-17 -152G/A polimorfizmi hasta ve kontrol grubunda incelendiğinde genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunurken allel frekanslarının dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla, $p=0.0300$; $p=0.160$). Bizim sonuçlarımız, IL-17 -152G/A promotör polimorfizminin AA ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak -152G/A polimorfizminin IL-17'nin ekspresyonunu nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir.

AA'nın patogenezi günümüzde henüz anlaşılmiş değildir fakat şu ana kadarki çalışmalar güçlü bir şekilde T hücre aracılı otoimmün bir süreci desteklemektedir (15). Son zamanlarda özellikle T hücre aracılı otoimmün hastalıkların tedavisinde IL-17 cazip bir ilaç hedefi olarak görülmektedir (11). Yapılmış olan birçok çalışmaya rağmen AA ve IL-17 sitokini arasındaki ilişki kesin olarak açıklanmamakla beraber yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Xing L, Dai Z, Jabbari A, Cerise JE, Higgins CA, Gong W, et al. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med.* 2014; 20(9):1043–1049.
2. Dai Z, Xing L, Cerise J, Wang EH, Jabbari A, de Jong A, et al. CXCR3 Blockade Inhibits T Cell Migration into the Skin and Prevents Development of Alopecia Areata. *J Immunol* 2016; 197(4):1089-99.
3. Kim SK, Park HJ, Chung JH, Kim JW, Seok H, Lew BL, et al. Association Between Interleukin 18 Polymorphisms and Alopecia Areata in Koreans. *Journal Of Interferon & Cytokine Research* 2014;34(5).
4. Han YM, Sheng YY, Xu F, Qi SS, Liu XJ, Hu RM, et al. Imbalance of T-helper 17 and regulatory T cells in patients with alopecia areata. *Journal of Dermatology* 2015; 42: 981–988.
5. Zhang X, Zhao Y, Ye Y, Li S, Qi S, Yang Y, et al. Lesional infiltration of mast cells, Langerhans cells, T cells and local cytokine profiles in alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 2015; 307:319–331.
6. Bodemer C, Peuchmaur M, Fraitag S, Chatenoud L, Brousse N, Prost Y. Role of Cytotoxic T Cells in Chronic Alopecia Areata. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 112–116.
7. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The Polymorphism of IL-17 G-152A was Associated with Childhood Asthma and Bacterial Colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol* 2010; 30:539–545.
8. Kim BS, Park YJ, Chung Y. Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation. *Arch. Pharm. Res.* DOI 10.1007/s12272-016-0823-8.
9. Aytakin N, Akcali C, Pehlivan S, Kirtak N, Inaloz S. Investigation of interleukin-12, interleukin-17 and interleukin-23 receptor gene polymorphisms in alopecia areata. *Journal of International Medical Research* 2015; 43(4): 526–534.
10. Elela MA, Gawdat HI, Hegazy RA, Fawzy MM, Abdel Hay RM, Saadi D, et al. B cell activating factor and T-helper 17 cells: possible synergistic culprits in the pathogenesis of Alopecia Areata. *Arch Dermatol Res.* 2016; 308:115–121.
11. Tojo G, Fujimura T, Kawano M, Ogasawara K, Kambayashi Y, Furudate S, et al. Comparison of Interleukin-17- Producing Cells in Different Clinical Types of Alopecia Areata. *Dermatology* 2013;227:78–82.
12. Atwa MA, Youssef N, Bayoumy NM. T-helper 17 cytokines (interleukins 17, 21, 22, and 6, and tumor necrosis factor- α) in patients with alopecia areata: association with clinical type and severity. *International Journal of Dermatology* 2016; 55: 666–672.
13. Lew BL, Cho HR, Haw S, Kim HJ, Chung JH, Sim WY. Association between IL17A/IL17RA Gene Polymorphisms and Susceptibility to Alopecia Areata in the Korean Population. *Ann Dermatol.* 2012;24(1):61-5.

14. Alli R, Nguyen P, Boyd K, Sundberg JP, Geiger TL. A mouse model of clonal CD8(+) T lymphocyte-mediated alopecia areata progressing to alopecia universalis. *J Immunol* 2012; 188: 477–486.
15. Ito T, Tokura Y. The role of cytokines and chemokines in the T-cell-mediated autoimmune process in alopecia areata. *Experimental Dermatology*, 2014; 23: 787–791.

