



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**BEHÇET HASTALARINDA HLA-B51
GENOTİP VE EKSPRESYON SIKLIĞININ
İNCELENMESİ
SBAG-2388
100S223**

2004-225
~~2000~~

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Committee

**BEHÇET HASTALARINDA HLA-B51
GENOTİP VE EKSPRESYON SIKLIĞININ
İNCELENMESİ**

SBAG-2388

100S223

TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Öncelikli Proje Kurulunca İstanbul Kültür Üniversitesi, İktisadi İdari Bilimler Fakültesi, İktisadi İstatistik ve Ekonometri Bölümü, İktisadi İstatistik Anabilim Dalı, Sağlık İstatistikleri Anabilim Dalı, Sağlık İstatistikleri Araştırma Grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Denizli bölgesinde yaşayan Behçet hastalarının HLA-B51 genotip ve ekspresyon sıklığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, HLA-B51 genotip ve ekspresyon sıklığının Behçet hastalarında ve sağlıklı bireylerdeki sıklığının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, HLA-B51 genotip ve ekspresyon sıklığının Behçet hastalarında ve sağlıklı bireylerdeki sıklığının karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, HLA-B51 genotip ve ekspresyon sıklığının Behçet hastalarında ve sağlıklı bireylerdeki sıklığının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**YARD. DOÇ. DR. AYFER ATALAY
PROF. DR. HÜSEYİN BAĞCI
DOÇ. DR. CEM YILDIRIM
DOÇ. DR. EROL ÖMER ATALAY**

**MART 2003
DENİZLİ**

ÖNSÖZ

1937'de Dr. Hulusi Behçet tarafından ilk olarak üveit, ağız aftları ve genital ülserleri ile tanımlanan Behçet hastalığının oluşumundaki etken/ler tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bilim ve teknolojinin gelişimiyle birlikte bu hastalığın epidemiyolojik, fizyopatolojik ve genetik boyutunda bir çok bulgu elde edilmiştir. Bu bulgulardan birisi de Behçet hastalığı ile HLA-B51 molekülü arasındaki bağlantının ortaya çıkarılmasıdır. Moleküler genetik yöntemlerinin gelişimi HLA-B51 molekülünün 34 allelinin varlığını ortaya çıkarmıştır. HLA-B51 molekülü ile Behçet hastalığı arasındaki ilişkileri açıklamaya yönelik araştırmalar devam etmektedir.

TÜBİTAK, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu ile Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri grubu tarafından desteklenen bu projede, Denizli bölgesinde yaşayan Behçet hastalarında HLA-B*51011 alleline rastlanma sıklığı ile bu molekülün ekspresyon sıklığı arasındaki bağlantıları incelemeyi amaçladık.

İÇİNDEKİLER

I.	ÖZ	6
II.	ABSTRACT	7
III.	GİRİŞ	8
IV.	GENEL BİLGİLER	9
	Behçet Hastalığı	
	Major Histokompatibilite Kompleksi	
	HLA Sınıf I Moleküllerinin Özellikleri	
	Behçet Hastalığı ile HLA-B51 Allellerinin Bağlantı Analizleri	
V.	GEREÇLER VE YÖNTEMLER	11
	Örnekler	
	Periferik Kan Örneklerinden DNA Saflaştırılması	
	Periferik Kan Örneklerinden mRNA Saflaştırılması	
	HLA-B51 Bölge Primer ve Probların Seçimi	
	HLA-B51 Bölge Çoğaltımı	
	DNA-PCR Yöntemi	
	RT-PCR Yöntemi	
	PCR Ürünlerinin Nokta Emdirimi	
	Oligonükleotid Probların İşaretlenmesi	
	Hibridizasyon	
VI.	BULGULAR	13
	Behçet Hastalarının Klinik Bulguları	
	HLA-B51 Bölgesine Özgün Primer ve Probların Özellikleri	
	DNA-PCR ile RT-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	
	Hibridizasyon Sonuçlarının Karşılaştırılması	
VII.	TARTIŞMA VE SONUÇ	15
VIII.	KAYNAKLAR	19
IX.	TABLolar	
X.	ŞEKİLLER	

ÖZ

İpek Yolu boyunca dağılım gösteren Behçet hastalığının etyopatogenezi tam olarak açıklanmamıştır. Multisistemik bir hastalık olan Behçet hastalığında genetik ve çevresel etkenlerin katkıları araştırılmaktadır. Behçet hastalığı ile HLA-B51 bağlantısının açıklanması hastalığın genetik yatkınlığını işaret etmiştir.

Bu araştırmada Denizli bölgesindeki Behçet hastalarında HLA-B51 gen ekspresyon oranı ile HLA-B51 allel dağılımlarını araştırdık. 50 normal sağlıklı birey ile 35 Behçet hastalığı tanısı almış kişiden alınan kan örnekleri araştırmamızda kullanıldı. HLA-B51 genini çoğaltabilecek primerler ile bölgeye özgün proplar laboratuvarımızda tasarlanmıştır.

HLA-B51 bölgesi için hazırlanan primerler kullanılarak yapılan DNA-PCR yöntemi ile normal sağlıklı bireylerde %58 oranında, Behçet hastalarında %63 oranında bölge çoğaltımı elde edilmiştir. RT-PCR yöntemi ile 29 normal sağlıklı bireyde %90 oranında, 22 Behçet hastasında %77 oranında bölge çoğaltımı elde edilmiştir.

Prob hibridizasyon sonuçlarına göre normal sağlıklı bireylerde %8 oranında B*51011, %2 oranında B*5115 ve B*5105, Behçet hastalarında %11 oranında B*51011, %3 oranında B*5115 ve B*5129 allellerini taşıdığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, Behçet hastaları ile sağlıklı normal gruplardaki HLA-B51 ekspresyonunda ve HLA-B51 allellerinin dağılımlarında önemli bir farklılık olmadığı kanısına vardık.

ABSTRACT

Behçet Disease (BD) is commonly seen in countries like Turkey, Middle East countries, Tunisia and Japan placed on the historical Silk Road. Although the etiopathogenesis of BD is not well known, the development of the disease is considered with the environmental and genetic predisposition when the geographical and incidence is concerned. The hypothesis of the key role of HLA-B51 depends on the research findings obtained from Japanese patients. On the other hand; the exact relationships in between HLA-B51 molecule and the development of the BD is still not well known. Recent molecular and biotechnological developments confer the polymorphic structure of the HLA antigens of which HLA-B51 belongs.

In this research project; we aimed to investigate the HLA-B51 genotype and its expression level in between Behçet Disease patients living in Denizli province of Turkey. For the investigation of these data, we used 35 BD and 50 normal healthy controls. Blood samples were taken from these individuals for the isolation DNA and RNA. The RT-PCR technique was used for the identification of expressed HLA alleles. The specific primers and probes were designed in our research group.

For the HLA-B51 region specific PCR amplification, we obtained that the presence of HLA-B51 was 58 % in controls, and 63 % in BD patients. The expression patterns obtained by RT-PCR technique resulted as 90 % expression for controls, and 77 % for BD patients. As far as specific probe hybridization experiments for the allelic composition is concerned, we obtained presence of 8 % for B*51011, 2 % B*5115 and B*5105 in controls, and 11 % B*51011, 3 % B*5115 and B*5129 alleles.

As a result; we concluded that there is no relationship in between BD and the presence and expression of HLA-B51 alleles compared to the normal healthy controls.

GİRİŞ

Etyopatogenezi tam olarak açıklanamayan Behçet hastalığı, İpek Yolu boyunca Türkiye, Orta Doğu, Tunus ve Japonya gibi ülkelerde daha sık rastlanan bir hastalıktır. Hastalığın sıklık oranı ile bölgesel dağılımı arasındaki bağlantı bu hastalığın gelişiminde çevresel etkenlerle genetik yatkınlığın önemli olduğunu vurgulamaktadır. Japon Behçet hastalarında HLA-B51 molekülü sıklığının önemli derecede yüksek olduğunun gösterilmesi, bu hastalığın gelişiminde genetik etkenlerin önemli olduğu hipotezini güçlendirmiştir. HLA-B51 molekülünün Behçet hastalığının gelişimindeki rolü tam olarak açıklanamamaktadır. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojik yöntemlerin gelişimi ile HLA-B51 molekülünün içinde yer aldığı HLA antijenlerinin olağanüstü polimorfizmi açığa çıkarılmıştır.

Bu araştırma ile ülkemizde HLA-Behçet hastalığı ilişkilerini aydınlatmaya yönelik araştırmalara katkıda bulunmak için Denizli bölgesinde yaşayan Behçet hastalarında HLA-B51 genotip sıklığı ile bu genotipin ekspresyon sıklığı arasındaki ilişkileri araştırmayı öngördük.

“Behçet hastalığı Araştırma Ünitesi” kapsamında “Behçet Hastalarında HLA-B51 Genotiplerinin İncelenmesi” (Pro. No.SBAG-Ü-16/13) isimli projede ülkemizdeki Behçet hastalarında RT-PCR temeline dayalı yöntemlerle HLA-B*5101 allelinin frekansının araştırılmıştı. Bu projede Behçet hastaları ile normal sağlıklı bireylerde HLA-B51 frekansının saptanmasının yanı sıra, bu genin gruplardaki ekspresyon oranlarını incelemeyi öngördük.

GENEL BİLGİLER

BEHÇET HASTALIĞI

Behçet Hastalığı (BH) Türk Dermatoloğu olan Dr. Hulusi Behçet tarafından “tekrarlayan oral ülserler”, “genital ülserler” ve “hipopiyon uveitis” ile tanımladığı inflamatuvar bir hastalıktır. Günümüzde bu üçlü bulgu dışında akciğer, böbrek, eklemler, vasküler sistem, merkezi sinir sistemi gibi vücudun diğer organ ve dokularının da işe karıştığı kronik multisistemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (1). BH'nın neden veya nedenleri tam olarak açıklanmamakla birlikte genetik ve çevresel etkenlerin kompleks ilişkilerinin sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir (2).

BH'da başlangıç bulguları oral aftöz ülserler (%47-86), genital ülserler (%0-19), deri lezyonları (%0-27), oküler lezyonlar (%0-35), artropati (%0-24), nörolojik bulgular (%0-12) ve vasküler bulgular (%0-3) sırasıyla belirtilmesi, bu hastalığın tanısında ağız ve genital ülserleri ile deri ve oküler lezyonların önemini vurgulamaktadır (3,4).

BH'nın neden/nedenlerini açıklamaya yönelik yoğun araştırmalar bu hastalığın gelişiminde bağışıklık sisteminin önemli bir rol oynadığı, ancak belirgin bir özelliğin öne geçemediği belirtilmektedir (5,6,7,8).

1973 yılında Ohno ve arkadaşları tarafından Japon BH'da HLA-B5 molekülünün güçlü bağlantısının açıklanması hastalık ile genetik yatkınlık arasındaki ilk bulgudur (4).

HLA SINIF I MOLEKÜLLERİNİN ÖZELLİKLERİ

HLA-A, -B ve -C gruplarından oluşan HLA sınıf I glikoproteinleri iki farklı polipeptit zinciri içerir. İnsan HLA sınıf I molekülünün α (ağır) zinciri 44 kilodalton olup HLA gen kompleksi içinde yer alırken, 12 kilodaltonluk β zinciri 15. kromozomda kodlanır (9, 10, 11,12).

Türlerin evrimi sırasında yapısı ileri derecede korunan HLA sınıf I β zinciri, daha önce insan idrarında saptanan bir peptide benzerlik gösterdiği için α_3 olarak isimlendirilmiştir. β_2 mikroglobulin HLA sınıf I molekülündeki ağır zincirin α_3 bölgesi ile homolog yapıda olup, olgun HLA sınıf I molekülünde bu bölge ile bağlantısının yanı sıra α_1 ve α_2 bölgeleriyle de ilişki kurar. β_2 mikroglobulin HLA sınıf I moleküllerinin yapısının sabit kalmasına katkıda bulunarak olgun molekülün hücre zarına taşınmasında etkin rol oynar (9, 10, 11,12).

HLA-A, -B ve -C proteinlerini kodlayan genler 6. kromozomun p21.3 bölgesine yerleşmiştir ve bu genlerin anatomisi birbirine benzer, 7 ekzon ve 6 introndan oluşmuştur. Birinci ekzon olgun sınıf I proteininde bulunmayan sinyal peptidi kodlar. 2. ekzon α_1 kısmını, 3. ekzon α_2 kısmını, 4. ekzon α_3 kısmını kodlarken 5., 6. ve 7. ekzonlar transmembran kısmı ile sitoplazmik kısmı ve poliA kısmını kodlamakta ve her bir sınıf I glikoproteinini kodlayan genin 5' tarafında genin transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici diziler bulunmaktadır (12).

1970'li yıllarda Zinkernagel ve Doherty virus peptitlerinin MHC sınıf I molekülleri ile CD8+ T hücrelerine sunulduğunu keşfettiler. Bugün, T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli olan yabancı peptit/MHC/TCR kompleksinin oluşumunda MHC ve TCR molekül yapılarının oldukça önemli rolü olduğu bilinmektedir. MHC sınıf I molekülleri hücre içinde sentezi yapılan yabancı proteinlere ait peptitleri CD8+ T hücrelerine sunmalarının yanı sıra eksprese oldukları hücreleri sitotoksik saldırılardan da korurlar (12).

Başlangıçta serolojik olarak tiplendirilen HLA moleküllerinin gelişen teknolojilerle patojenlerin polimorfizmine koşut olarak ileri derecede polimorfik yapılar içerdiği saptanmıştır. Bu açıdan bakıldığında HLA sınıf I grubunda 275 farklı HLA-A, 521 farklı HLA-B, 134 farklı HLA-C, 6 farklı HLA-E, 1 HLA-F ve 15 farklı HLA-G alleli saptanmıştır. Uluslararası Histokompatibilite Çalışma Grubu (International Histocompatibility Working Group, IHWG) yaklaşık her ay yeni allelerin kimliklendirilmesinden dolayı HLA listesinin gözden geçirildiğini vurgulamaktadır (13). HLA sınıf I moleküllerindeki polimorfizmin genellikle peptit bağlanma bölgelerinde yer aldığı, diğer bölgelerin büyük çoğunlukla korunduğu saptanmıştır. HLA sisteminde polimorfizmin yapı-işlev ilişkilerine yansımaları yoğun olarak araştırılmaktadır (14, 15).

HLA moleküllerinin bireyler arası doku nakli işlemindeki öneminin yanı sıra özellikle otoimmün ve immün sistemle bağlantılı hastalıklarda da etkileri saptanmıştır. Otoimmünite ile HLA sistemi arasındaki ilişkiler net olarak açıklanamamakla birlikte belirli hastalıklarda belli bir HLA tipinin sıklıkla bulunduğu saptanmıştır. Behçet hastalığı ile HLA-B51 molekülü arasındaki ilişki bu konulardaki örneklerden biridir (12).

HLA-B51 molekülü başlangıçta serolojik olarak isimlendirilen HLA-B5 molekül grubunda yer alan HLA sınıf I molekülüdür. Günümüzde moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak HLA-B51 grubunun da yaklaşık 34 farklı alleli bulunduğu saptanmıştır (13).

BEHÇET HASTALIĞI İLE HLA-B51 ALLELLERİNİN BAĞLANTI ANALİZLERİ

BH ile HLA-B51 bağlantısı gösterilmiştir. Bu markerın varlığı değişik serilerde 1.5-16 odds oranına sahiptir. B-51 molekülünün BH'da yatkınlık ve şiddetin göstergesi olup olmadığı önemli bir sorudur.

BH ile HLA-B51 bağlantısının değişik toplumlarda farklı bulunması ve bu ilişkinin İpek Yolu'yla bağlantılı bölgelerde sınırlı olması hastalığın B51'le olan ilişkisinin tekrar değerlendirilmesine yol açmıştır (16). HLA sınıf I moleküllerinin antijen bağlama özellikleri ile antijen sunumu sırasında T hücreleriyle ilişki kurma özellikleri araştırılmaktadır. Bunun yanı sıra HLA gen kompleksinde yer alan diğer bilinen veya bilinmeyen genlerle BH arasındaki bağlantıları açığa çıkarmak için de yoğun araştırmalar yapılmaktadır (14, 16).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

ÖRNEKLER

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Hastanesi Göz Polikliniğine başvuran ve Uluslararası Behçet Hastalığı Çalışma Grubu Değerlendirme ve Tanı Kuralları'na göre BH tanısı almış 35 Behçet hastasının kan örnekleri çalışmamızda kullanıldı (17). Hastaların klinik bulguları Tablo-1'de verilmiştir. Kontrol olarak BH tanı kriterlerinde belirtilen klinik bulguları olmayan 50 sağlıklı normal kişiden alınan kan örnekleri kullanıldı.

PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA SAFLAŞTIRILMASI

Disodyum EDTA'lı vakumlu tüplere alınan periferik kandan taze olarak DNA saflaştırılması için alınan kitte (DNA isolation kit for mammalian blood, 1 667 327, Roche) verilen işlemler uygulanarak genomik DNA elde edildi.

PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNDEN mRNA SAFLAŞTIRILMASI

Disodyum EDTA'lı vakumlu tüplere alınan periferik kandan taze olarak mRNA saflaştırılması için alınan kitte (mRNA isolation kit for blood/bone marrow, 1 934 333, Roche) verilen işlemler uygulanarak mRNA elde edildi.

HLA-B51 BÖLGE PRİMER VE PROBLARIN SEÇİMİ

HLA-B51 alleleline özgün bölgenin çoğaltımı için listesi Tablo-2'de sunulan diğer HLA allellerinin gen dizileri internet aracılığı ile GenBank'tan elde edildi (18). Bu diziler bilgisayar ortamında HLA-B*51011(M32319, GenBank) gen dizileri ile karşılaştırıldı. Tablo-3'de HLA-B51 grubu içinde yer alan diğer allellerin dizi karşılaştırılması örnek olarak verilmiştir. Bu tablonun dışında HLA-B*51011 gen dizisi HLA-B , -A ve -C gruplarından seçilen toplam 103 gen dizisiyle de karşılaştırılarak farklı bölgeler saptandı. Bu farklı bölgeler dikkate alınarak HLA-B51 bölgesine özgün primerler (Oligo, Ver 4.0-1341, Primer Analysis Software, 1989-91, Wojuech Rychlike, Almanya) saptandı ve bu programda önerilen Tm (60°C) derecesi PCR'da birleşim (annealing) ısı olarak kullanıldı. Aynı bilgisayar programı ile HLA-B5101 aleline özgün proplar belirlendi. Tablo-4'te çalışmada kullanılan primer ve propların listesi verildi.

DNA-PCR YÖNTEMİ

BH ve sağlıklı kontrol gruplarının saflaştırılan DNA örneklerinde HLA-B51 bölge çoğaltımı için primer-132 ve primer-671 ile Taq DNA polimeraz (0.5 U/µl;EP0402, Fermentas) kullanımı için önerilen polimeraz zincir reaksiyon (PCR) karışımı hazırlandı. PCR karışımı ısıl döngü aletinde (Techne, Technegene Temperature Cycler) aşağıda belirtildiği şekilde programlanan programda HLA-B51 bölge çoğaltımı gerçekleştirildi.

95°C'de	60 saniye
62°C'de	45 saniye
72°C'de	120 saniye
Toplam	35 döngü
72°C'de	5 dakika

Program bitiminde HLA-B51 bölgesine ait PCR ürünlerinin olup olmadığı %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

RT-PCR YÖNTEMİ

Periferik kan hücrelerinden elde edilen mRNA örnekleri tek tüpte RT-PCR yönteminin uygulandığı kit ile (Titan one tube RT-PCR system, 1 888 382, Roche) primer-132 ve primer-671 kullanılarak HLA-B51 bölge çoğaltımı yapılmıştır. RT-PCR karışımı ısı döngüsel aletinde aşağıda belirtildiği şekilde programlanan programda HLA-B51 bölge çoğaltımı gerçekleştirildi.

50°C'de	30 dakika
94°C'de	20 saniye
62°C'de	30 saniye
68°C'de	60 saniye
Toplam	40 döngü
68°C'de	7 dakika

Program bitiminde HLA-B51 bölgesine ait PCR ürünlerinin olup olmadığı %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

PCR ÜRÜNLERİNİN NOKTA EMDİRİMİ

Hem DNA-PCR hem de RT-PCR yöntemlerinde HLA-B51 bölge çoğaltımı tesbit edilen örnekler naylon membrana tesbit edildi (19).

OLİGONÜKLEOTİD PROBLARIN İŞARETLENMESİ

Tablo-3'te listesi verilen probların 3' ucu birden fazla digoksinin-dUTP takılarak işaretlenmesi kitle (DIG oligonucleotide tailing kit, 1 417 231, Roche) verilen öneriler çerçevesinde gerçekleştirildi.

HİBRİDİZASYON

DIG ile kuyruklanmış problarla karşılaştırılan nokta emdirim yapılan naylon membrandaki örneklerle hibridize olan probları saptamak için enzim immünoassay ve enzimle katalize edilen renk reaksiyonuna dayalı yöntemin uygulandığı kitle (DIG nucleic acid detection kit, 1 175 041, Roche) verilen öneriler çerçevesinde HLA-B*51011 alleline sahip olan örnekler tesbit edildi.

BULGULAR

BEHÇET HASTALARININ KLİNİK BULGULARI

Araştırmamıza alınan 35 BH'nın cinsiyetle birlikte diğer bulguları Tablo-5'te özetlenmiştir. Çalışmaya alınan erkek BH'larının (%66) oranı kadın hastaların (%34) yaklaşık iki katı oranındadır. Hastaların tümünde oral aft bulunmaktadır ve genital lezyon %74 oranı ile oral aft bulgusunu takip etmektedir. Nöral bulgu ve gastrointestinal bulgu %3 oranı ile en düşük saptanan bulgular arasındadır.

Klinik araştırmalarda follikülit, eritema nodosum, paterji, oral aft veya genital lezyonları, diğer bir deyişle mukokütanöz lezyonları olan hastalar hafif BH; mukokütanöz bulgularla birlikte artriti olan hastalar ara tip BH; mukokütanöz lezyonlar olsun veya olmasın oküler lezyonu, vaskülit veya nöral bulgusu olanlar ise ağır BH olarak tanımlanmaktadır. Bu değerlendirmeler temel alınarak Tablo-6 hazırlanmıştır.

Çalışmaya alınan BH ve normal sağlıklı bireylerin kan örneklerinin hepsinde DNA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelde kontrolü yapılan DNA örneklerinin bir grubu Şekil-1'de gösterilmiştir.

HLA-B51 BÖLGESİNE ÖZGÜN PRİMER VE PROBLARIN ÖZELLİKLERİ

HLA-B51 bölgesine özgün primer ve problemlerin seçiminde kullanılan gen dizileri olgun HLA glikoproteinindeki α (ağır) zincirini kodlayan mRNA dizilerini içermektedir. Araştırmamızda kullandığımız primer ve problemlerin HLA-B*51011 genindeki yerleşimleri Tablo-7'de sunulmuştur. Primer ve problemlerin isimlendirilmesinde dizisindeki nükleotid dizi sırası temel alınmıştır.

Primer-132 olarak isimlendirdiğimiz 5' primeri HLA-B51 mRNA nükleotid dizisinde 2. ekzonun 59. nükleotidi ile 78. nükleotidi arasındaki bölgeye karşılık gelmektedir. Primer-671 olarak isimlendirdiğimiz 3' primeri 4. ekzonun 33. nükleotidi ile 52. nükleotidleri arasındaki bölgeye karşılık gelmektedir.

Primer-132 ve -671 kullanılarak DNA-PCR yöntemi ile 1340 nükleotidlik bölgenin, RT-PCR yöntemi ile 539 nükleotidlik bölgenin çoğaltımı programlanmıştır. Bu primerler teorik olarak, karşılaştırma yaptığımız diziler arasında HLA-B51 dışında sadece HLA-B*7801 allelini de çoğaltabilmektedir. Bunun dışında, HLA-B51 allelleri arasında B*51012, B*51022, B*5105 ve B*5115 allellerinin çoğaltımı teorik olarak bu primerlerle mümkün olmamaktadır.

Araştırmamızda kullandığımız problemler (prob-301 hariç) HLA-B*51011 allelini diğer HLA-B51 allellerinden ayırd edebileceğimiz 2. ve 3. ekzonlarda saptanan farklı nükleotidlerin bulunduğu bölgelerde yer almaktadır ve bu bulgular Tablo-8'de özetlenmiştir. Prob-301 HLA-B51 allellerini B*7801 allelinden ayırd edebilen genel bir problemdir. Seçilen oligonükleotid problemlerin teorik olarak HLA-B51 gen dizisini tanıyabildikleri bölgeler aşağıda özetlenmiştir;

Prob-263 : 2. ekzonun 190. nükleotidi ile 209. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-301 : 2. ekzonun 228. nükleotidi ile 248. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-351 : 2. ekzonun 8. nükleotidi ile 28. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-404 : 2. ekzonun 61. nükleotidi ile 92. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-524 : 3. ekzonun 181. nükleotidi ile 200. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-542 : 3. ekzonun 201. nükleotidi ile 219. nükleotidi arasındaki bölge.

Prob-568 : 3. ekzonun 225. nükleotidi ile 244. nükleotidi arasındaki bölge.

DNA-PCR İLE RT-PCR SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Normal sağlıklı bireylerin DNA örneklerinden primer-132 ve -671 kullanılarak yapılan PCR sonuçları Şekil-2'de sunulmuştur. 50 sağlıklı kontrolün DNA-PCR yöntemiyle 29 örnekte (%58) HLA-B51 bölge çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Şekil-2).

BH'nın DNA örneklerinden primer-132 ve -671 kullanılarak yapılan PCR sonuçları Şekil-3'de sunulmuştur. 35 BH'nın DNA-PCR yöntemiyle 22 örnekte (%63) HLA-B51 bölge çoğaltımı yapılabilmektedir (Şekil-3).

DNA-PCR yönteminde çoğaltım yapılabilen normal sağlıklı kişilerle BH olan kişilerin kan lizatlarından mRNA saflaştırılması yapıldıktan sonra primer-132 ve -671 kullanılarak RT-PCR yöntemi uygulandı. 29 normal sağlıklı bireylerin örneklerinden 26 tanesinde çoğaltım sağlanırken, 1 örnekte (%3) şüpheli sonuçlar ve 2 örnekte (%7) çoğaltım ürünü gerçekleşmediği saptandı (Şekil-4). Benzer şekilde, 22 BH örneklerinden 17 tanesinde (%77) çoğaltım ürünü gözlenirken, 2 örnekte (%9) şüpheli sonuçlar ve 3 örnekte (%14) çoğaltım ürünü olmadığı gözlemlendi (Şekil-5).

Normal sağlıklı bireyler ve BH örneklerinde DNA-PCR ürünü saptanan fakat RT-PCR ürünü şüpheli olan veya gözlenmeyen olguların prob hibridizasyon sonuçları incelendiğinde, bu olguların HLA-B51 tiplendirilmesinde sonuç alınmadığı gözlemlenmiştir.

HİBRİDİZASYON SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

DNA-PCR yöntemiyle HLA-B51 primerleriyle çoğaltım ürünü saptanan örnekler naylon membrana nokta emdirim yöntemiyle sabitleştirildikten sonra DIG ile işaretli problemlerle hibridizasyon işlemlerinin görüntüleri bilgisayar ortamına alınmıştır. Bu görüntülerden bir örnek Şekil-6'da ve tüm problemlerin değerlendirme sonuçları Tablo-9'da (sağlıklı bireylerin) ve Tablo-10'da (BH bireylerin) verilmiştir. DNA-PCR ve RT-PCR çoğaltım ürünleri elde edilen 29 normal sağlıklı örneklerden 2 tanesinde (%7) ve 22 BH'dan 2 tanesinde (%9) kullanılan problemlerin hiçbirisiyle pozitif sonuç alınmamıştır. Seçilen tüm problemler HLA-B*51011'e özgün olduğu için problemlerin hepsi ile pozitif sonuç alınan örnekler B*51011 alleli olarak kabul edilmiştir. Tablo-11'de DNA-PCR, RT-PCR ve prob hibridizasyon sonuçları özetlenmiştir.

BH'nın klinik bulguları ile prob pozitifliği dağılımı homojen olmasının yanı sıra, HLA-B*51011 olduğu tespit edilen 4 hastanın klinik bulgularında da öne geçen herhangi bir bulgu saptanmamıştır. Normal bireylerde, prob-263 ile 18 (%36); prob-301 ile 16 (%32); prob-351 ile 13 (%26); prob-404 ile 9 (%18); prob-524 ile 13 (%26); prob-542 ile 19 (%38) ve prob-568 ile 12 (%24) pozitif sonuç alınmıştır. Benzer şekilde, BH'da prob-263 ile 14 (%40); prob-301 ile 14 (%40); prob-351 ile 8 (%23); prob-404 ile 8 (%23); prob-524 ile 9 (%26); prob-542 ile 14 (%40) ve prob-568 ile 10 (%29) pozitif sonuç alınmıştır. Bu bulgular normal sağlıklı bireyler ile BH'da prob pozitifliği arasında anlamlı bir farklılığın olmadığını göstermektedir. DNA-PCR ve prob-301 pozitif olma durumunda, HLA-B51 olarak tanımladığımızda, normal sağlıklı kişilerde %40 oranı BH grubunda %40 oranı ile gruplar arasında fark olmadığı gözlemlenmiştir.

Normal sağlıklı kişilerden 4 tanesinin (%8) B*51011, 1 tanesinin (%2) ve 1 tanesinin (%2) B*5105 ; BH'dan 4 tanesinin (%11) B*51011, 1 tanesinin (%3) B*5115, 1 tanesinin B*5129 allelini taşıdığı saptanmıştır. Görüldüğü gibi araştırmalarda kullandığımız BH ile normal sağlıklı bireylerdeki HLA-B allellerinin dağılımında belirgin bir özellik bulunmamaktadır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk kez Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral ve genital ülserler ile üveitle tanımlanan BH oluşum işlergeleri henüz tanımlanmamıştır. BH günümüzde değişik organ ve dokularında işe karıştığı multisistemik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. BH'nin coğrafik dağılımı ve klinik bulguları hastalığın genetik ve çevresel etkenlerin karşılıklı ilişkilerinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı görüşünü desteklemektedir (4).

Araştırmamıza katılan BH grubunda erkek:kadın oranı 1.9 olup, erkeklerdeki klinik bulgularda ağır tip BH, kadınlarda ise mukokutanöz tip BH'nin daha fazla oranda olduğu görülmektedir. Dokuzuncu Uluslararası Behçet Hastalığı Konferansı'nın yayımlanan bildirisinde oral aftöz ülserler %92-100, genital ülserler %57-93, deri lezyonları %38-99, oküler lezyonlar %29-100 ve artropati %16-84 oranında verilmiştir. Tablo-3'te sunulan klinik bulgularda oral aftöz ülserler %100, genital ülserler %74, deri lezyonları %41, oküler lezyonlar %46 ve artropati %43 oranında saptanmış olup uluslararası verilerle paralellik göstermektedir (4,16). Bu bilgiler ışığı altında, projede sağlıklı kontrol grubunda yer alan bireylerde uluslar arası BH tanı kriterlerinde belirtilen klinik bulgulardan herhangi birinin bulunmamasına dikkat edildi. Özellikle oral ülserasyon tanımı yapan bireyler bu araştırmada yer almamaktadır (17).

Ohno ve arkadaşları 1973 yılında BH ile HLA-B5 fenotipi arasındaki bağlantıyı açıkladıklarında bu hastalığın kalıtsal yönü araştırılmaya başlandı. Takip eden süreçte Japon, Çinli, İspanyol, Arap, Türk ve Yunanlı BH'lerinde da benzer bağlantılar elde edilmiştir (6). Ancak bu konudaki ilk araştırmalar HLA-B5 molekülünün serolojik olarak tanımlanması ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler gen teknolojilerindeki ilerlemeler HLA moleküllerinin serolojik olarak tanımlanmasının yeterli olmadığını açığa çıkarmıştır. Günümüzde BH ile HLA-B ilişkilerinde tanımlanan HLA-B5 glikoproteininin HLA-B*5101 olduğu ve B51 grubunda yaklaşık 34 farklı allelin yer aldığı tanımlanmıştır (20, 21). Bu gelişmelerin sonucu olarak, bu hastalığın ortaya çıkış neden/nedenleri BH ile HLA-B51 arasındaki bağlantıların ilişkisi farklı yaklaşımlarla araştırılmaya devam etmektedir.

BH ile HLA-B51 arasındaki bağlantı Asya toplumlarında %81 olarak verilirken Batı toplumlarında %13 olarak verilmektedir (2,16). Bu konu ile ilgili olarak yaptığımız bir araştırmada BH ile mRNA düzeyinde HLA-B51 oranını %17 olarak saptamıştık (22). Diğer bir araştırmada hastalığın şiddetinin HLA-B51'le ilişkili olmadığı gösterilmiştir (23).

BH'nin gelişimine HLA-B51 molekülünün hangi düzeyde katkısı olduğu araştırmaları devam etmektedir. BH ile ısı şoku proteinlerinin HLA-B ekspresyonuna etkisinin incelendiği bir projede ısı şokuna maruz bırakılan BH periferik kan lökositlerinde HLA-B'nin mRNA normal sağlıklı kişilere ve romatoid artritli kişilere göre daha fazla oranda olduğunu gözledik (24).

HLA sınıf I molekülleri temel olarak yabancı antijenleri CD8+ T hücrelerine sunarak bağışıklık sistemini uyarırlar. BH ile HLA sınıf I ailesi içinde bulunan HLA-B51 molekülü arasındaki ilişki ile bu hastalıkta temel olarak özgün olmayan hücresel yanıtlarda artışın bulunması hastalığın patogenezinin açıklanmasında yeni yaklaşımların gelişmesine neden olmuştur (4). HLA sınıf I moleküllerinin diğer bir işlevi eksprese oldukları hücreleri sitotoksik hücrelerin saldırılarından korumasıdır. NK, CD8+ ve $\gamma\delta$ TCR+ hücrelerde eksprese edilen ve öldürücü immünoglobüline benzer reseptör (killer immunoglobulin-like reseptör, KIR) adı verilen bir reseptör ailesinin HLA sınıf I moleküllerinde korunmuş bölgelerdeki epitoplara bağlanması sitotoksik hücrenin seçici inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu konuyla bağlantılı olarak, HLA-B molekülünde α 1-heliksindeki 77-83. pozisyonlardaki

KIR'lerinin bağlandığı bölgeye karşılık gelen gen bölgesinin BH'daki dağılımı araştırılmış ve belirgin bir bağlantı bulunamamıştır (25).

B51'in antijene özgün bölgesi analiz edilmiş, ve olasılıkla 8-10 amino asit uzunluğundaki dizilerdeki antijenik peptitler rapor edilmiştir. Timidilat sentetaz (aa 253-261), guanin-nükleotid bağlanma protein β alt birimine benzer protein 12.3 (aa 192-200), retinal S veya bir maya proteini olan UBC5 (aa 61-68) gibi otoantijenlerden ayrılan peptitler bu aday epitoplara arasındadır. HLA-B*5101 BH ile ilişkili olan HLA-B51'in major alt tipidir ve BH ile bağlantılı olmayan fakat B5'ten ayrılan HLA-B*5201'den farklıdır, sadece antijen bağlanma oluşunda B paketindeki 63 ve 67. pozisyonlardaki iki amino asiti farklıdır. Bu amino asitler olasılıkla peptit bağlama için önemli bağlanma rezidüleridir. Benzer şekilde, B*5101'den 171. pozisyonda B*5102 ve 167. pozisyonda B*5103 farklıdır. Bununla birlikte, *5102 ve *5103 çok nadir rastlanan aleller olup BH ile bağlantıları olup olmadığı bilinmemektedir. Elimizdeki bu bilgilerle, aday bir "Behçetogenik" epitopu DAIXXXXXF olarak tanımlanan *5101 tarafından sunulur, ve aynı epitopla ilişki kurabilen *5108 ve *5109 alt tipleri son olarak BH'larında saptanmıştır. HLA-B51'e özgün peptitlerin rolü ve BH'nın oluşumunda HLA-B51'le sınırlı CD8+ T hücrelerinin rolü olup olmadığı günümüzde bilinmemektedir. BH ile HLA-B*5201'le güçlü bir şekilde bağlantılı olan Takayasu artriti arasındaki benzerlik ve yüksek sıklıkta BH rastlandığı Japonya gibi ülkelerdeki dağılımı dikkate değerdir. Olasılıkla HLA-B*5101 ve *5201'in kendi iki amino asit değişiklikleri nedeniyle bağlanan peptitlerdeki farklılıkların aynı coğrafik bölgede çok farklı klinik spektruma neden olabileceğini gösteriyor (7).

Bu projede BH ile normal sağlıklı kişilerin HLA-B51 gen ekspresyonunda bir değişikliğin olup olmadığını ve HLA-B*51011 allel frekansını araştırdık. Çalışmamızda kullandığımız primer ve problemlerin tasarımını kendi laboratuvarlarımızda gerçekleştirdik. GenBank'tan elde edilen (Tablo-3) toplam 103 HLA sınıf I gen dizisi bilgisayar ortamında bir araya getirilerek karşılaştırıldı. HLA-B51 bölge çoğaltımı yapılan primerler teorik olarak bu gen dışında HLA-B*7801 allelini de çoğaltabilmektedir. Prob-301 HLA-B51 ile *7801 allellerini ayırd edebilen bir prob olmasının dışında KIR'lerinin bağlanma bölgesine de karşılık gelmektedir. Araştırmamızda kullanılan primer ve problemlerin bir kısmının Mizuki ve arkadaşları tarafından HLA-B51 ile ilgili bir çalışmalarında kullandıkları primerlerle aynı bölgelerde yer aldığını belirledik (20).

Primer ve prob seçimi sırasında HLA-B51 grubunda yer alan 34 farklı allel dizisi temel alınmıştır (21). Bu allellerin dışında HLA-B*510111 - 510116 olarak isimlendirilen 6 alt grubunun daha olduğunu ve tümü de BH bireylerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Bu gruptaki allelleri incelediğimizde gen düzeyinde HLA-B*51011'den bazı farklılıklarının intron bölgelerinde yer aldığını saptadığımız için çalışmalarımızda kullanılmamıştır (18). Tablo-8 incelendiğinde HLA-B*51013, *51015, *5124, *5126, *5127N ve *5128 allellerini HLA-B*51011'den ayırd edebilen herhangi bir probun çalışmalarımızda kullanılmadığı görülebilir. Ancak kullanılan primerlerin HLA-B51 grubuna özgün olmasının yanı sıra genel bir prob olarak prob301'in kullanılması en azından çalışmaya aldığımız gruplarda HLA-B51 frekansını saptamamızı mümkün kılmıştır. Bu araştırmaya başladığımızda HLA-B51 grubunda bu kadar fazla allel tanımlanamamıştı. Dolayısı ile hazırlanan bütçe ile bu allelleri ayırd edebilecek problemleri satın almamız mümkün olmamıştır.

HLA-B51 gen bölge çoğaltım primerleri kullanılarak DNA-PCR yöntemi ile normal sağlıklı bireylerde (%58) ve BH olan bireylerde (%63) benzer oranlarda çoğaltım ürünü elde edilmiştir. Aynı primerlerle DNA-PCR yöntemi ile çoğaltım ürünü elde edilen 29 normal (%90) ve 22 hasta örnekleri (%77) RT-PCR yöntemi ile çoğaltım ürünü elde edilmiştir. Sağlıklı normal bireyler ile BH grubunda gözlenen oranların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($P>0.22$) (Tablo-7 ve -8).

Normal sağlıklı kişiler ve BH'nın HLA-B51 ekspresyonlarında istatistiksel olarak bir anlam bulunmamasına karşın normal bireylerdeki %90 oranı ile BH'da %77 oranı arasında sayısal olarak belirgin bir fark bulunmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarının sayıca az olması istatistiksel olarak anlamsız bulunmasına katkısı olabileceğini düşünüyoruz. Araştırma grubuna aldığımız hasta bireylerin tedavi için kullandıkları ilaçların HLA-B51 ekspresyonuna etkisi olabileceği olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Diğer bir olasılık DNA-PCR ve RT-PCR yöntemlerinde kullandığımız primerlerin HLA-B51 grubuna özgün olması HLA-B moleküllerinin normal ve sağlıklı bireylerdeki ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları yansıtmamasından kaynaklanıyor olabilir. Isı şokunun HLA-B ekspresyonuna etkisini araştırdığımız çalışmamız, bu bölgenin çoğaltımında HLA-B51 grubunun dışındaki allelleri de çoğaltabilecek şekilde tasarlanmıştı (24). İki çalışmada çelişkili sonuçların elde edilmesi kullanılan primer setlerinden kaynaklanıyor olabilir.

B*51012, B*51022, B*5105 ve B*5115 allelleri ayırd edebilecek problemlerimizin olmamasına karşın, Tablo-11'de normal sağlıklı kişilerin prob hibridizasyon sonuçları incelendiğinde normal ve hasta gruplarındaki dağılımlarındaki benzerlikler göze çarpmaktadır. Hem genel HLA-B51 probu olması hem de KIR bağlanma bölgesine karşılık gelmesinden dolayı prob-301 sonuçlarını incelediğimizde normal (%32) ve hasta gruplarında (%40) benzer oranlarda pozitif olduğu görülür. Bu sonuçlar Gül ve arkadaşlarının KIR bağlanma bölgelerine karşılık gelen gen bölgelerini inceledikleri çalışma ile paralellik göstermektedir (19). Diğer taraftan, normal sağlıklı bireylerde %8 oranında B*51011, %2 oranında B*5115 ve B*5105 saptanırken, BH'larında %11 oranında B*51011, %3 oranında B*5115 ve B*5129 olduğunu saptadık. Sonuçlar karşılaştırıldığında HLA-B51 allel dağılımlarında önemli farklar bulunmadığı gözlemledik. Ayrıca B*51012, B*51022, B*5105 ve B*5115 allelleri de ayırd edebildiğimizde bu oranların değişebileceğini göz önünde bulundurmamız gereklidir.

Denizli bölgesindeki BH'da HLA-B51 oranı (%40) açısından bakıldığında Asya toplumlarındaki (%81) orandan daha düşük, Batı toplumlarındaki (%13) orandan daha yüksektir. Buna karşın, BH'da HLA-B*51011 oranı (%11) açısından bakıldığında Batı toplumlarındaki orandan da düşük olduğunu görüyoruz (2). Araştırmamızda normal ve hasta gruplarında benzer HLA-B51 oranları, Yunan (BH, %80; normal, %26) ve Fas (BH, %30; normal, %15) toplumlarında normal ve hasta gruplarında önemli farklılıkları gösteren bulgularla uyumlu değildir (21,25). Gül ve arkadaşları Türk BH'larında %60, normalde %24 HLA-B51 bulunduğunu rapor etmişlerdir (19). Laboratuvarımızda elde ettiğimiz oranlarla uyumlu olmamasının yanı sıra, normal ve hasta gruplarındaki HLA-B51 oranlarında önemli farklılıkların bulunması da bulgularımızla uyumlu değildir. Bu araştırmalarda HLA-B51 genotipinin saptanması PCR-SSP (polimerase chain reaction-sequence specific primers) yöntemi ile yapılmıştır. Biz HLA-B51 genotipini PCR-nokta emdirim-hibridizasyon yöntemi ile saptadık. Yöntemler arası farklılıkların bu derece farklı sonuçlar vermesi dikkat çekicidir. Diğer yandan, Türkiye'nin farklı bölgelerinde (İstanbul, Denizli) gerçekleştirilen çalışmalar olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Son olarak, daha önce yaptığımız benzer araştırmada BH'larında saptadığımız HLA-B51 oranı (%17) ile bu araştırmada elde edilen oranlar birbiriyle uyumludur.

Özetle, bu araştırmamızda BH ile normal sağlıklı kişilerdeki HLA-B51 ekspresyon oranıyla HLA-B51 allel dağılımlarında önemli bir farklılığın olmadığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak;

- Denizli bölgesinde HLA-B51 grubunun dağılımları Asya toplumlarındaki dağılımlarla benzerlik göstermemektedir.
- Böyle araştırmaların sayıca daha fazla hasta ve kontrol gruplarında tekrarlanması daha tartışılabilir bulgular elde edilebilmesini sağlayabilir.
- HLA-B51 gen ekspresyonu araştırmalarında, araştırmaya alınan kişilerin değişik çevresel etkenlerinin (ilaç vs.) etkileri en aza indirgenmiş ortamlarda, örneğin kültüre alınan hücrelerde gerçekteştirilmesi ile sonuçların karşılaştırılmasının daha sağlıklı olabileceği düşüncesindeyiz.
- HLA sınıf I genlerinin promotor bölgelerinde saptanan polimorfizm etkilerinin incelenmesi bu konudaki bulguların daha iyi yorumlanmasına neden olabilir.
- HLA-B gen ekzonlarındaki polimorfizmlerin yanı sıra intron bölgelerindeki polimorfizmlerin bu genlerin ekspresyonlarına katkısı henüz bilinmemektedir.
- HLA sistemindeki olağanüstü polimorfizmlerinin ve fenotipe etkilerinin ortaya çıkarılması PCR-hibridizasyon yöntemleri yerine DNA dizi analiz yöntemiyle araştırılması daha kısa zamanda ve daha düşük maliyetle gerçekteştirilebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Önder M., Gürer M.A.; The multiple faces of Behçet's disease and its aetiological factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15; 126-136, 2001.
2. Sakane T., Takeno M., Suzuki N., Inaba G.; Behçet's disease. *New Engl J Med*, 341 (17): 1284-1291, 1999.
3. Zouboulis C.C.; Epidemiology of Adamantiated-Behçet's disease. *Ann Med Interne*, 150 (6): 488-498, 1999.
4. Schirmer M., Calamia K.T., Direskeneli H.; Ninth international conference on Behçet's disease, Seoul, Korea, May 27-29, 2000. *J Rheumatol*, 28 (3); 636-639, 2001.
5. Emmi L. Brugnolo F., Salvati G., Marchione T.; Immunopathological aspects of Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*, 13: 687-691, 1995.
6. Mizuki N., Ohno S.; Immunogenetic studies of Behçet's disease. *Rev Rhum*, 63 (7-8): 520-527, 1996.
7. Direskeneli H.; Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis*, 60; 996-1002, 2001.
8. Ekşioğlu-Demiralp E., Direskeneli H., Akoğlu T.; Levels of serum transforming growth factor- β 1 do not increase in Behçet's disease, in contrast to rheumatoid arthritis.
9. Major histocompatibility complex. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober J.S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. 2nd ed. W.B. Saunders Company, Pennsylvania. s. 96-114, 1994.
10. Brodsky F.M.; Antigen presentation and the major histocompatibility complex. *Medical Immunology*. 9th ed., Stites D.S., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, Connecticut, 2001, 83-94.
11. Parakevas, F., Foester, J. : Cell interactions in the immun response. Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W., Lukens, J.N., ed. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th ed , Lea & Febiger, USA, s. 432-441, 1993.
12. Turner, M., Owen, M. : Antijen receptor molecules. Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K., ed. *Immunology*, 3rd ed. Mosby, London, s. 4.1- 4.20, 1993.
13. www.anthonynolan.com/HIG/.
13. Kikuchi A., Sakaguchi T., Miwa K., Takamiya Y., Rammensee H.G., Kaneko Y., Takiguchi M.; Binding of nonamer peptides to three HLA-B51 molecules which differ by a single amino acid substitution in the A-pocket. *Immunogenetics*, 43; 268-276, 1996.

15. Sakaguchi T., Ibe M., Miwa K., Kaneko Y., Yokota S., Tanaka K., Takiguchi M.; Binding of 8-mer to 11-mer peptides carrying the anchor residues to slow assembling HLA class I (HLA-B*5101). *Immunogenetics*, 45:259-265, 1997.
16. Zouboulis C.C., Epidemiology of Adamantiated_Behçet's disease. *Ann Med Interne*, 150(6); 1999.
17. International Study Group for Behçet's Disease; Criteria for diagnosis Behçet's disease. *Lancet*, 335: 1078-1080, 1990.
18. www.ncbi.nlm.nih.gov
19. Çırakoğlu B., Atalay E.Ö., Bermek E.; Beta talaseminin moleküler hibridizasyon yöntemleriyle tanısı ve incelenmesi (Uygulamalı Eğitim Kursu). TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, 1989.
19. Gül A., Uyar F.A., İnanç M., Öcal L., Barrett J.H., Aral O., Koniçe M., Saruhan-Direskeneli G.: A weak association of HLA-B*2702 with Behçet's disease. *Genes Immunity*, 3; 368-372, 2002.
20. Mizuki N., Ohno S., Ando H., Chen L., Palameris G.D., Stavropoulos-Ghiokas E., Ishihara M., Goto K., Nakamura S., Shindo Y., Isobe K., Ito N., Inoko H.: A strong association between HLA-B*5101 and Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens*, 50; 57-60, 1997.
21. www3.ebi.ac.uk/Services/imgt/hla/cgi-bin/allele.cgi.
22. Atalay A., Ekşioğlu-Demiralp e., Direskeneli H., Akoğlu T.: Behçet hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde stres proteinlerinin HLA-B51 ekspresyonuna etkisi. Pro. No. 1995-SA-19, İstanbul, 1996.
23. Gül A., Uyar F.A., İnanç M., Öcal L., Tugal-Tutkun I., Aral O., Koniçe M., Saruhan-Direskeneli G.: Lack of association of HLA-B*51 with a severe disease course in Behçet's disease. *J. Rheumatol*, 40 (6); 668-72, 2001 (Abstr.).
24. Atalay A., Behçet hastalarında HLA-B51 genotiplerinin incelenmesi. Pro. No. SBAG-Ü-16/13, İstanbul, 1998.

TABLÖLAR

HN	C	P	F	E	OA	OL	GL	A	V	NB	Diger
1	E	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2	E	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
3	K	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
4	E	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
5	E	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
6	E	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
7	E	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
8	K	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
9	E	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
10	E	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
11	K	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
12	E	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	E	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
14	K	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
15	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	E	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
17	E	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
18	E	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
19	E	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
20	E	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21	E	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
22	E	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
23	K	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
24	E	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
25	K	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
26	K	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
27	K	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Gl
28	K	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
29	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	E	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
31	K	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
32	K	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
33	E	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
34	E	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
35	E	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tablo-1: Behçet hastalarının klinik bulguları.

Kısaltmalar:

HN : Hasta numarası

C : Cinsiyeti

P : Paterji

F : Follikülit

E : Eritemanodosum

OA : Oral aft

OL : Oküler lezyon

GL : Genital lezyon

A : Artrit

V : Vaskülit

NB : Nöral bulgu

Gl : Gastrointestinal bulgu

No	Allel Adı	Genbank No	Baz Sayısı
1	B*51011	M32319	1089
2	B*51012	AJ278903	1089
3	B*51013	AF135550	546
4	B*51014	AJ249937	546
5	B*51015	HLA01579	1012
6	B*51021	M68964	1089
7	B*51022	L41925	1089
8	B*5103	M80670	1089
9	B*5104	Z15143	1089
10	B*5105	AJ297934	822
11	B*5106	U31334	546
12	B*5107	X94481	546
13	B*5108	U52815	1089
14	B*5109	U58319	546
15	B*5110	AF004370	677
16	B*5111N	Y13566	823
17	B*5112	AF023442	546
18	B*51131	AJ002151	546
19	B*51132	AF135534	546
20	B*5114	AF054005	546
21	B*5115	AF072445	546
22	B*5116	AF098264	546
23	B*5117	AF136395	546
24	B*5118	AJ133773	546
25	B*5119	AJ238971	546
26	B*5120	AF140861	546
27	B*5121	AF176079	546
28	B*5122	AF248061	546
29	B*5123	AF226844	546
30	B*5124	AJ276995	546
31	B*5126	AY016209	546
32	B*5127	AF363789	546
33	B*5128	HLA01537	546
34	B*5129	HLA01568	822
35	B*0801	M24036	1089
36	B*1301	M24075	1093
37	B*1303	U14943	1030
38	B*1401	M24040	1089
39	B*1511	L11604	1089
40	B*1521	L32862	1098
41	B*1801	M24039	1089
42	B*2201	AF179658	1089
43	B*2702	L38504	1089
44	B*2711	D83043	1100
45	B*3501	U11265	968
46	B*35012	L42281	1089
47	B*3502	U30936	1089
48	B*3511	L40599	1089
49	B*3515	U30904	1089
50	B*3531	AF170577	1089
51	B*3701	M32320	1093
52	B*3801	L36591	1089
53	B*3901	M94052	1089
54	B*40011	U03698	1089

No	Allel Adı	Genbank No	Baz Sayısı
55	B*4101	M24035	1089
56	B*4201	M24034	1089
57	B*4402	M24038	1089
58	B*4501	X61710	1089
59	B*4601	M24033	1089
60	B*4701	M19756	1093
61	B*4801	M84380	1098
62	B*4901	M24037	1089
63	B*5001	X61706	1089
64	B*5301	M58636	1089
65	B*5401	M77774	1089
66	B*5501	M77778	1089
67	B*5601	M77776	1089
68	B*5701	M32318	1089
69	B*5801	AB008102	1093
70	B*5901	L07743	1089
71	B*67011	L17005	1089
72	B*7301	U04787	1092
73	B*7801	M33573	1089
74	B*7802	L41214	1089
75	B*8201	U36492	1089
76	A*0101	M24043	1098
77	A*0201	M84379	1098
78	A*0301	U32184	1098
79	A*1101	X13111	1411
80	A*2301	M64742	1098
81	A*2402	M64740	1098
82	A*2501	M32321	1098
83	A*2601	U32184	1098
84	A*2902	X60108	1095
85	A*3001	M30576	1098
86	A*3202	X97120	1098
87	A*3301	M30580	1098
88	A*3401	X61704	1098
89	A*3601	X61700	1098
90	A*4301	X61703	1098
91	A*6601	X61711	1098
92	A*7401	X61701	1098
93	CW*0102	M84171	1101
94	CW*0201	M24030	1101
95	CW*0302	M84172	1101
96	CW*0401	M84386	1100
97	CW*0801	M84174	1101
98	CW*12021	M28171	1101
99	CW*1402	U06487	1101
100	CW*1601	U41420	1101
101	CW*1701	X98742	1119
102	CW*1801	X96582	1101
103	G*01012	M32800	1309

Tablo-2: Araştırmamızda HLA-B51 geni ile karşılaştırma yaptığımız allellerin listesi.

KODU	NÜKLEOTİD BAZ DİZİSİ (5'→3')	µG/OD	NMOL/OD	TM(°C)	TM(°C) ³
132 ¹	CCG CTT CAT TGC AGT GGG C	34,3	5,92	60,5	60,5
671 ²	GTG GCC TCA TGG TCA GAG AC	31,9	5,19	58,3	58,3
263	CAC AGA TCT TCA AGA CCA A	30,2	5,25	54	50,3
301	AAC CTG CGG ATC GCG CTC CG	33,7	5,54	68	65,9
351	CAC TTG GCA GAC GAT GTA TG	31,5	5,12	60	54,4
404	GCG GGC ATA ACC AGT ACG CCT ACG ACG GCA AA	31,3	3,18	102	71,5
524	GTG AGG CGG AGC AGC TGA G	31,2	5,24	64	61,2
542	GAG CCT ACC TGG AGG GCC T	33,0	5,67	64	61,7
568	GAG TGG CTC CGC AGA CAC C	32,4	5,60	64	61,1

Tablo-4. HLA-B51 genotiplendirilmesinde kullanılan primer ve probalar.

1. HLA-B51 bölge çoğaltımında kullanılan 5' primeri
2. HLA-B51 bölge çoğaltımında kullanılan 3' primeri
3. Oligonükleotit üretici firma tarafından 50 mM NaCl varlığında verilen değerler

Klinik bulgular	Erkek	Kadın	Toplam	
			Sayı	%
	23	12	35	100
	66	34	-	-
Paterji	4	5	9	26
	19	7	26	74
Folikülit	15	6	21	60
	8	6	14	40
Eritemanodosum	7	6	13	37
	16	6	22	63
Oral aft	23	12	35	100
	-	-	-	-
Oküler lezyon	11	5	16	46
	12	7	19	54
Genital lezyon	18	8	26	74
	5	4	9	26
Artrit	12	3	15	43
	11	9	20	57
Vaskülit	2	3	5	14
	21	9	30	86
Nöral bulgu	1	-	1	3
	22	12	34	97
Diğer	-	1	1	3
	23	11	34	97

Tablo-5: Çalışmaya alınan BH'nın değerlendirilmesi.

Hastalığın tipi	Erkek		Kadın		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Mukokutanöz tip	6	26	6	50	12	34
Ara tip	5	22	1	8	6	17
Ağır tip	12	52	5	42	17	49
Toplam	23	-	12	-	35	-

Tablo-6: Behçet hastalarının klinik bulgularına göre gruplandırılması.

Ekzon 1	1 atgctggta cggcgcggc aaccgtctc ctgctctt gggggcagt ggcctgacc 61 gagacctgg cgg
Ekzon 2	74 gctccactc catgagttat ttctacacc ccattgccc gcccggccg ggggagcc cc 134 <u>gcttcttgc agtgggc</u> tac gtagcagaca cccagttct gaggttcag agcgacggcg 194 ctagtccgag gacggagccc cggggccat ggatagaca ggagggggcg gagtattggg 254 accggaa cac acagatctc aagaccaa ca cacagacta ccgagag aac ctgggatcg 314 cgtctcg cta ctacaaccag agcgaggccg
Ekzon 3	345 ggtctca cac ttggcagag atgtatg gct ggcagggg gccggaggg cgcctctcc 405 ggggcaata ccagtacc ccagcggca aagattact cgcctgaac gaggacctga 465 gctctggac cggggcgac acccggtc agatcacc cgcgaagtgg gaggcgccc 525 <u>gtgaggcga gcagctgaga gctacctgg agggcct</u> gtc cgtg gagtgg ctccgagac 585 ac ctggagaa cgggaaggag acgtgcagc gcggg
Ekzon 4	620 acccccaca gacacagtg acccaccacc cc <u>gtctctga ccagagcc ac</u> cctgaggt 680 gctggccct gggctctac cctgggaga tcacctgac ctggcaggg gatggcgagg 740 accaaactca ggacctgag cttgtggaga ccagaccagc aggagataga acctccaga 800 agtggcagc ttggtgtg cttctggag aagagcagag atacatgc catgtacagc 860 atgagggct gccgaagccc ctacctga gatggg
Ekzon 5	897 agcatctc ccagtcacc atcccatcg tggcattgt tctggctg gctgctag 957 cagtttgt catcgagct ggtgctca ctgtatgtg taggaggaag agctcag
Ekzon 6	1014 gtagaaaag agggagctac tctaggtc cgt
Ekzon 7	1038 ccagcagag tgcagggc tctgatgt ctctcagc ttgaaaag

Tablo-7: Araştırmada kullanılan primer (koyu ve altı çizgili) ve problemlerin (koyu) HLA-B*51011 geni üzerindeki yerleşimleri.

Baz No:	PCR 132-671	RT-PCR 132-671	Prob 263	Prob 301	Prob 351	Prob 404	Prob 524	Prob 542	Prob 568
51011									
51012	+	-							
51013									
51014						+			
51015									
51021									+
51022	+	-							+
5103									+
5104					+				
5105	+	-					+		+
5106					+				
5107			+						
5108							+		
5109							+		
5110						+	+	+	+
5111N									
5112									
51131						+			
51132						+			
5114						+			
5115	+	+				+	+		+
5116								+	
5117						+			
5118						+			
5119								+	
5120			+				+		
5121								+	
5122			+						
5123									+
5124									
5126									
5127N									
5128									
5129							+		

Tablo-8: Primer ve problemlerin HLA-B*51011 ile diğer HLA-B51 allellerini ayırd edebildikleri bölgeler.

Örnek No	DNA-PCR	RT-PCR	Prob 263	Prob 301	Prob 351	Prob 404	Prob 524	Prob 542	Prob 568	HLA-B*
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-	+	-	5115
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	?
7	-	+	+	+	-	-	-	+	+	?
8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	?
9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	?
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	?	-	-	-	-	-	+	-	?
12	-	+	-	-	-	-	-	+	-	?
13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	+	+	+	-	+	-	+	-	51011
16	-	+	+	+	-	-	-	-	-	?
17	-	+	+	-	-	-	-	+	-	*
18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	?
19	-	+	-	-	-	-	-	-	+	?
20	-	+	+	-	-	-	-	+	-	?
21	-	+	-	-	-	-	-	-	-	?
22	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5105
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
30	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	+	-	51011
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	+	-	+	-	+	-	?
37	-	+	-	+	+	+	-	+	-	?
38	-	+	+	-	-	-	-	+	+	?
39	-	-	-	-	-	-	-	+	+	?
40	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	+	+	+	+	+	+	+	+	51011
45	-	+	-	+	-	-	+	+	-	?
46	-	+	-	+	+	-	+	+	+	?
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	+	-	+	+	+	+	+	+	51011
49	+	+	-	+	+	+	+	+	-	?
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	51011

Tablo-9 : Normal sağlıklı kişilerden elde edilen bulgular.

Örnek No	DNA-PCR	RT-PCR	Prob 263	Prob 301	Prob 351	Prob 404	Prob 524	Prob 542	Prob 568	HLA -B*
1	+	-	+	+	+	+	-	+	+	?
2	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?
3	+	?	-	+	+	+	-	+	+	51011
4	+	-	-	+	-	-	-	-	+	?
5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	?
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12	+	+	-	+	-	-	-	+	+	51011
13	+	-	-	-	-	-	-	+	-	?
14	+	?	-	+	-	-	-	+	-	?
15	+	-	-	-	-	-	-	+	-	?
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?
17	+	-	-	-	+	-	-	+	+	?
18	+	-	-	+	+	-	-	+	-	5115
19	+	+	-	+	+	-	-	+	+	51011
20	+	-	-	-	-	-	-	+	+	?
21	+	-	-	+	+	-	-	+	+	5129
22	+	-	-	-	-	-	-	+	+	?
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	+	-	-	-	-	-	?
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	+	+	-	-	+	+	51011
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	?
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

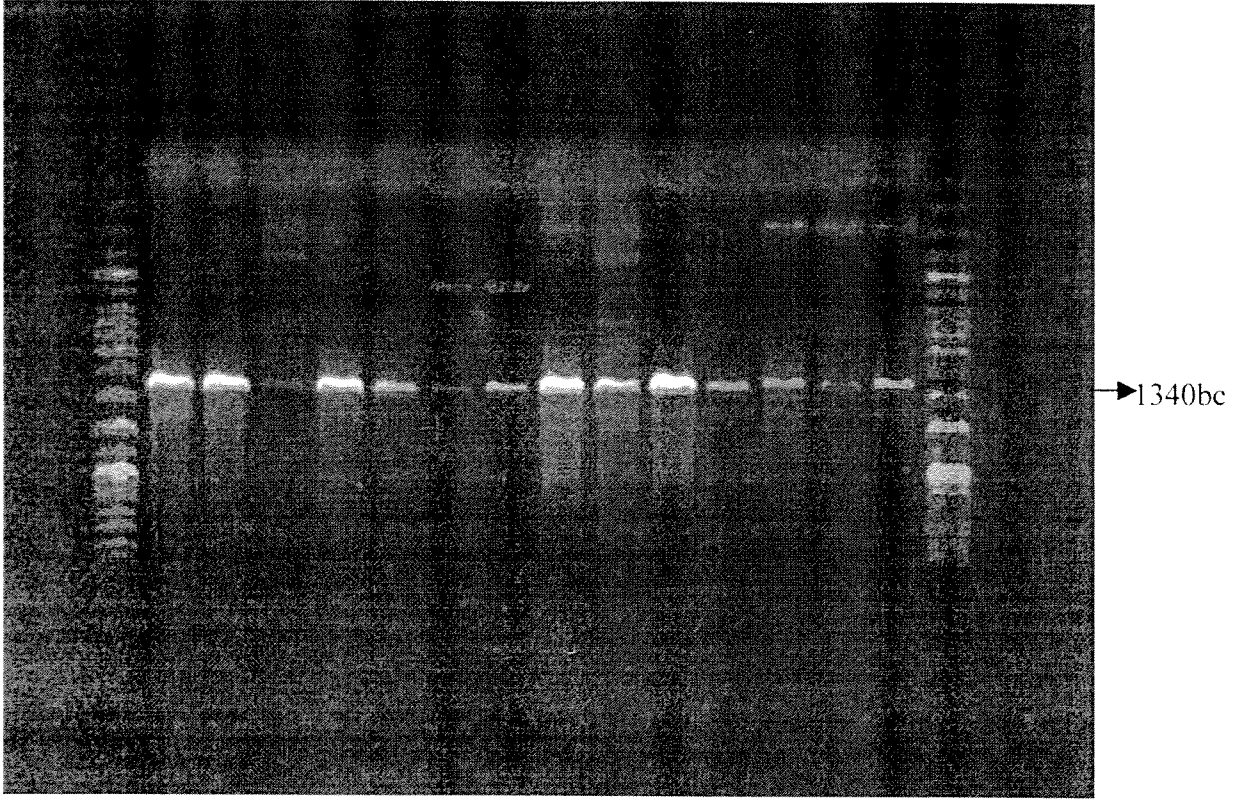
Tablo-10: BH'larından elde edilen bulgular.

	DNA-PCR		RT-PCR*		263		301		351		404		524		542		568	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Normal	29	58	22	90	18	36	16	32	13	26	9	18	13	26	19	38	12	24
BH	22	63	17	77	14	40	14	40	8	23	8	23	9	26	14	40	10	29

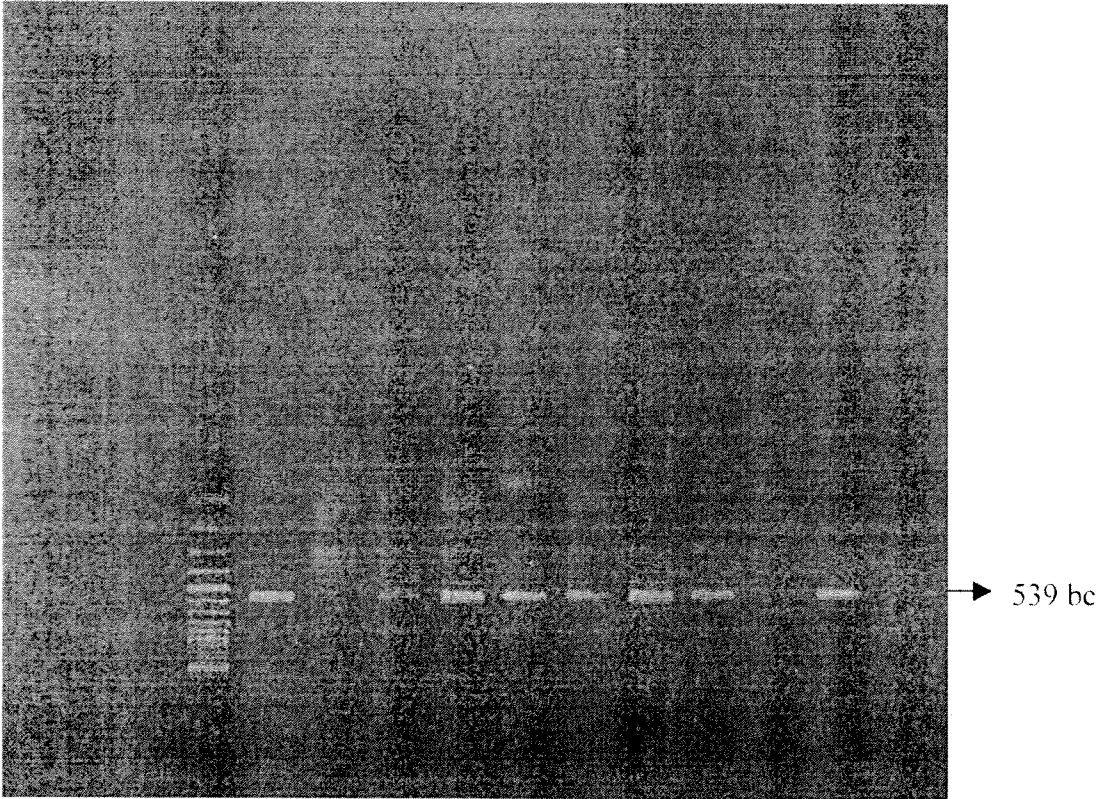
Tablo-11: Normal sağlıklı bireyler ile BH'da PCR ve prob hibridizasyonda pozitif sonuçların değerlendirilmesi.

* Normal: 22/29; BH:22/17, PCR'da pozitif sonuç alınan değerle temel alınmıştır.

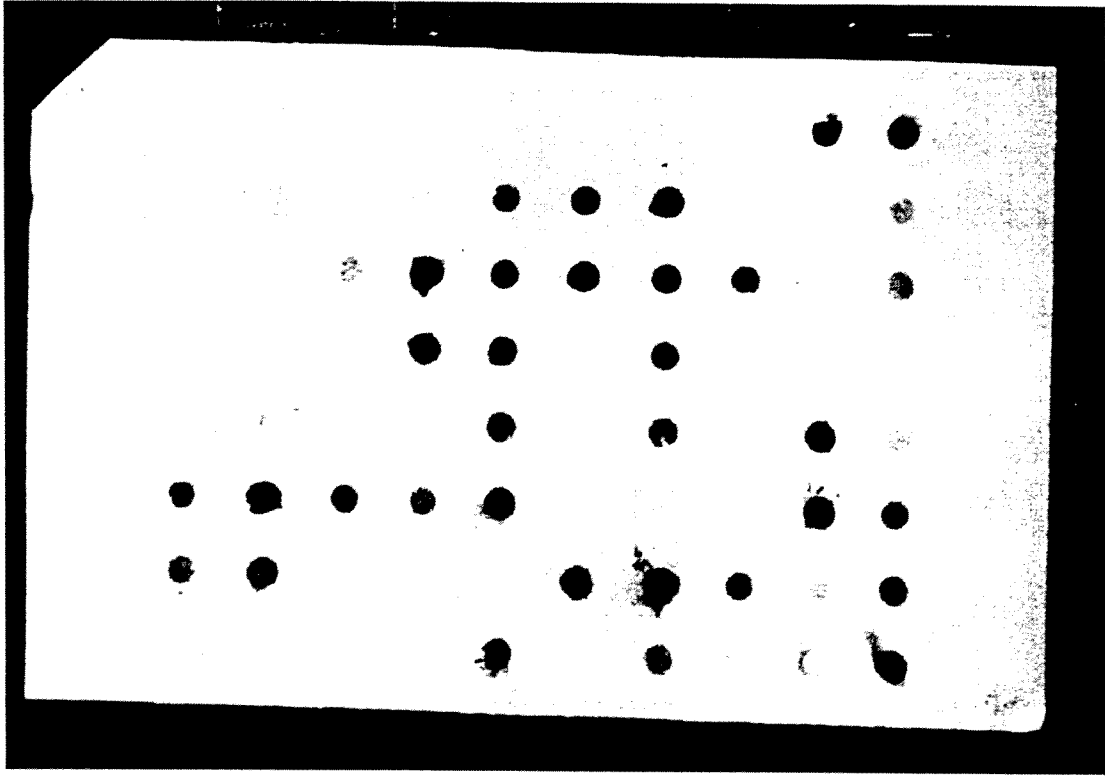
ŞEKİLLER



Şekil-1: BH 'larının DNA örnekleri ile gerçekleştirilen PCR sonuçları (DNA-PCR).



Şekil-2: BH 'larının mRNA örnekleri ile gerçekleştirilen PCR sonuçları (RT-PCR).



Şekil-3: DIG ile işaretli prob 301 ile yapılan hibridizasyon.

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: SBAG-2388 (100S223)		
Proje Başlığı: Behçet Hastalarında HLA-B51 Genotip ve Ekspresyon Sıklığının İncelenmesi.		
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yrd.Doç.Dr. Ayfer ATALAY, Doç.Dr. Cem YILDIRIM, Doç.Dr. Erol Ömer ATALAY, Prof.Dr. Hüseyin BAĞCI		
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: -Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kınıklı-DENİZLİ -Pamukkale Üniversitesi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi (PAMGEN), Kınıklı, DENİZLİ.		
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Fonu, Pro.No. 2001TPF020, DENİZLİ.		
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.Mart.2001 – 01.Mart.2002		
Öz (en çok 70 kelime): Multisistemik bir hastalık olan Behçet hastalığında genetik ve çevresel etkenlerin katkıları araştırılmaktadır. Behçet hastalığı ile HLA-B51 bağlantısının açıklanması hastalığın genetik yatınlığını işaret etmiştir. Bu araştırmada Denizli bölgesindeki Behçet hastalarında HLA-B51 gen ekspresyon oranı ile HLA-B51 allel dağılımlarını araştırdık. RT-PCR ve prob hibridizasyon sonuçlarına göre Behçet hastaları ile sağlıklı normal gruplardaki HLA-B51 ekspresyonunda ve HLA-B51 allellerinin dağılımlarında önemli bir farklılık olmadığı kanısına vardık.		
Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, HLA-B51		
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Yayına hazırlanıyor.		
Bilim Dalı:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doçentlik Bilim Dalı Kodu:		