

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOLL BENZERİ ALICI PROTEİNLERİNDEN TLR 2 (Arg677Trp)
VE TLR4 (Asp 299Gly ve Thr399Ile) GENİ ÜZERİNDEKİ
MUTASYONLARIN BEHÇET HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ VE
SIKLIKLARI

AYDIN KARABULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz-2007

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	x
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Behçet hastalığı.....	2
2.2 Behçet hastalığının klinik özellikleri.....	2
2.2.1 Ağız yaraları.....	2
2.2.2 Genital bölge yaraları.....	3
2.2.3 Deri lezyonları.....	4
2.2.4 Göz tutulumu.....	4
2.3 Hastalığın Tanısı	5
2.4 Tedavi.....	5
2.5 Etiyoloji.....	6
2.5.1 HLA tipi.....	6
2.5.2 Bakteri ve virüslerin hastalıktaki yeri.....	7
2.5.3 Endotel hücreleri ve nitrik oksit.....	8
2.5.4 HSP (Heat shock proteinlerin) hastalıktaki rolleri.....	9
2.5.5 Toll benzeri reseptörler ve Görevleri.....	9
2.5.5.1 Toll benzeri alıcı protein2 aminoasit dizilişi.....	11
2.5.5.2 Toll benzeri alıcı protein4 aminoasit dizilişi.....	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Kan Örneklerinin Eldesi.....	19
3.2 Gereçler.....	19
3.2.1 Kimyasal maddeler	19
3.2.2 Çözeltiler.....	20
3.3 DNA Eldesi	20

3.4 PCR ile, ilgili dizilerin çoğaltılması	21
3.4.1 Kullanılan primerler.....	21
3.4.2 Çalışılan Bölgelere göre PCR kimyasallar protokolleri	22
3.4.3 Çalışılan bölgelere göre thermal cycles zaman ısı protokolleri.....	24
3.5 Restriksiyon enzimi ile kesim.....	25
3.5.1. Restriksiyon enzimi ile kesim Protokolleri.....	25
3.6. Agaroze Jelin Hazırlanması ve RE'ne maruz bırakılan PCR Ürünlerinin	
görüntülenmesi.....	26
3.6.1. Elektroforez Koşulları.....	26
 4.BULGULAR VE SONUÇLAR.....	 27
4.1 Grupların mutasyon ve gen çokyapılılığı dağılımları.....	32
4.2 Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	15
5.TARTIŞMA.....	33
6.KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOLL BENZERİ ALICI PROTEİNLERİNDEN TLR 2 (Arg677Trp)
VE TLR4(Asp 299Gly ve Thr399Ile) GENİ ÜZERİNDEKİ
MUTASYONLARIN BEHÇET HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ VE
SIKLIKLARI

Aydın Karabulut

Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Temmuz 2007- 41 sayfa

Behçet hastalığı nedeni tam olarak anlaşılamamış, ağız yaraları, genital bölge ülserleri, eritema nodozum, ve buna eşlik eden üveitle karakterize edilen kronik iltihabı bir hastalıktır. Hastalığı bir bakterinin veya bir virüsün tetiklediği düşünülmektedir. Toll benzeri alıcı proteinlerin fonksiyonların anlaşılmasıyla beraber doğuştan gelen immün sistemin bakteri ve virüs antijenlerini toll benzeri alıcı proteinlerle algıladığı ortaya çıkmıştır. Toll benzeri alıcı proteinlerin bu bakteri ve virus antijenlerini tanımasıyla başlayan sinyal iletim mekanizması doğuştan gelen immün cevabı uyaran genlerin ifade edilmesini sağlar. Öte taraftan bu uyarı iletim sistemindeki bir bozukluk aşırı immün cevabın oluşmasına ve immün cevabın oluşmamasına neden olabilmekte ve buda Behçet hastalığının etyolojisinde rol oynayabilmektedir. Bu araştırmanın amacı Toll benzeri alıcı proteinlerde olan mutasyonların Behçet hastalığıdaki önemini araştırmaktır. Bu nedenle TLR 2 ve TLR 4 üzerinde bulunan TLR2 Arg677Trp, TLR4 (Asp299Gly , THR399Ile) mutasyonlarının Behçet Hastalığı ile ilişkisi ve mutasyonların Behçet hastalarında sıklığını kontrol etmek için bu mutasyonları içeren gen bölgeleri Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve bu çoğaltılan bölgeler Restriktion enzimi uzunluk polimorfizmleri yöntemi ile kontrol edilmiştir. Herhangi bir mutasyona rastlanmamasına rağmen THR399Ile için çoğaltılan bölgede hasta ve kontrol grubunda hem uzun(124 bp) hem kısa allele rastlanmıştır. Bu kısa allelin aranılan mutasyonla ilişkisi yoktur fakat daha önce böyle bir durum rapor edilmediği için bu kısa allelin sekans analizi yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı , toll like reseptörler, toll like reseptör mutasyonları

ABSTRACT

M.S. Thesis

TOLL LIKE RECEPTOR PROTEINS RELATED TLR2 (Arg677Trp) and TLR4(Asp299Gly and Thr399Ile) MUTATIONS IN BEHCET'S DISEASE AND SIGNIFICANCE OF THEIR FREQUENCIES ON THE ONSET OF THE DISEASE

Aydın Karabulut

University of Gaziantep-Graduate School of Health Sciences,
Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
July 2007-41 pages

Behçet disease is a chronic inflammatory disorders with an unknown reason characterized by oral aphthas, genital ulcers, erythema nodosum, and recurrent uveitis. Mostly, a Gram negative bacteria or a virus supposed to trigger the disease. Recent functional characterization of Toll-like receptors (TLRs) revealed the role of TLRs in innate immunity to detect the invasion of microbial pathogens. TLRs recognize microbial components that initiates signal transduction pathways which triggers expression of genes in the innate immune system. On the other hand, due to the structural polymorphism or mutation thereby prevent or trigger overactivation of innate immunity leading to some immune disorders, plays an important role in the innate immune system and etiology of Behçet disease. It is aimed to find out the significance of common mutations in TLRs among the patients with Behçet's disease. For this purpose, the relationship and the frequencies of TLR2 (Arg677Trp) and TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) mutations in Behçet's Disease were sought. The TLR gene regions were amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR) and underwent restriction enzyme digestion to screen by Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) for the mutations. In this study, the mutations in these regions were not found. Furthermore, TLR-4 Thr399Ile region revealed both long (124 bp) and short alleles in both control and Behçet's disease groups. The RFLP analysis of control and Behçet's disease group showed that the short allele is not the consequent of mutation rather a haplotype exist in this population. Therefore, the short allele, that was not reported before, needs to be determined by a sequence analysis.

Keywords: Behçet's Disease, toll like receptors, toll like receptor mutations, TLR-2 mutation, TLR-4 Asp299Gly mutation, TLR-4 Thr399Ile mutation.

TEŞEKKÜR

Değerli bilimsel katkılarından dolayı tez danışmanım Prof Dr. AHMET ARSLAN'a; klinik yardımlarından dolayı Yrd.Doç Dr. AHMET MESUT ONAT'a; tezimin deneysel aşamasında yardımlarından dolayı AYŞE KIZILYER ve ŞENAY GÖRÜCÜ YILMAZ'A , tezim boyunca bana maddi manevi desteklerinden dolayı SERDAR ÖZTUZCU, İBRAHİM HALİL YILDIRIM ve MEHRİ İĞCİ'ye tezim için gerekli primer çiftlerinden birisini bana ücretsiz olarak sağlayan Sultan medikal'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca vermiş oldukları moral ve destekten ve hayallerime inanıp beni hiç yalnız bırakmadıkları için SEVGİLİ AİLEMİN her bir bireyine teşekkür ederim.

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan primerler ve özellikleri.....	22
Tablo 2. TLR2 Arg677Trp için PCR kimyasallar protokolü.....	23
Tablo 3. Tlr4 Asp299Gly için PCR kimyasallar protokolü.....	24
Tablo 4. Tlr4 Thr399Ile için PCR kimyasallar protokolü.....	24
Tablo 5. TLR2 Arg677Trp için PCR zaman-ısı protokolü.....	25
Tablo 6. Tlr4 Asp299Gly için PCR zaman-ısı protokolü.....	25
Tablo 7. Tlr4 Thr399Ile için PCR zaman-ısı protokolü.....	25
Tablo 8. MspI için RE Kesim Protokolü.....	26
Tablo 9. HinfI için RE Kesim Protokolü.....	26
Tablo 10. NcoI için RE Kesim Protokolü.....	26
Tablo11. Polimorfik dağılım	15

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Bir Behçet hastasının ağız ve dil bölgesindeki yaralar.....3
- Şekil 2.** a;Erkek genital bölge yaraları, b;Kadın genital bölge yaraları3
- Şekil 3.** çeşitli şiddetde seyreden eritema nodozumlar 4
- Şekil 4.** Pan üveitli bir behçet hastasının gözünün dıştan görünümü..... 4
- Şekil 5.** İnsan lökosit antijen (HLA) bölgesi. HLA bölgesi kromozom 6p21.1 –p21.3 bölgesinde yer alıp, sınıf II ve sınıf III genleri uzun kol üzerinde ve sınıf I genleride kısa kol üzerinde yer almaktadır. Sınıf I gen ürünleri CD8 sitotoksit T lenfositlerin fonksiyonlarını sınırlarken organizmaların kendilerine ait olan antijenlere karşı ve virusun bulaştığı hedef hücelere karşı bağışıklık cevaplarına aracılık eder. Sınıf II HLA molekülleri yabancı antijenlerin T yardımcı hücrelerine sunumuyla ilgilidir. HLA Sınıf III bölgesi hücre aracılığı bağışıklık cevabı ile ilgil olmayan fakat bağışıklık sisteminin uyarlanmasıyla ilgili proteinleri ifade ederler. Ayrıca sınıf III gen ürünleri tümör nekroz faktörü (TNF), ısı şok proteinleri (HSP) ve C2, C4 gibi komplement proteinlerinin uyarlanması veya düzenlenmesinde görev alırlar.....7
- Şekil 6.** TLR lerin innate immün sistemde sinyal mekanizmasını başlatması ve olgunlaşmamış T hücrelerinin ortamdaki sitokinlere göre TH1 veya TH2 ye dönüşümü11
- Şekil 7.** Toll like reseptör ailesine ait değişik grup reseptörlerin iltihap tetikleyici proteinleri sentezlettirmesi.....12
- Şekil 8.** Kesim öncesi TLR-2 289 bç büyüklükte olduğu şekilden anlaşılmaktadır. Burada hepsi gösterilmemekle beraber farklı uzunlukta bir bant gözlenmemiştir.....28
- Şekil 9.** MspI RE Kesiminden sonra TLR-2 bandı 289 bç lik büyüklükte bir değişim gözlenmediğinden bu gen bölgesi için bir mutasyona rastlanmamıştır.....28
- Şekil 10.** TLR-4 299 primer çiftinin uygun PZR koşullarını ortaya koymak için uygun erime sıcaklığının kademeli olarak tayin edilmesi. Bu çalışmada en parlak 4. bantın (62°C) olduğu tesbit edilmiş ve bu primer çiftiyle yapılan çalışmalarda 62 °C kullanılmıştır29
- Şekil 11.** TLR-4 299 primerleriyle tanımlanan bölge PZR ile çoğaltılmış ve burada görüldüğü gibi diğer hastalardada farklı bir bant bulunmamıştır.29

Şekil 12. Bir kısım hastalara ait örnek gösterilen şekilde TLR-4 399 primerleriyle tanımlanıp PZR ile çoğaltılan bölgeler Nco I RE kesim enzimiyle muamele edilip yapılan tarama da farklı bantlar bulunmaması bu bölgede Behçet hastaları arasında bir mutasyon olmadığını göstermektedir.30

Şekil 13. TLR4 399 primer çiftinin PZR reaksiyonunun uygun çalışma koşullarını ortaya koymak için yapılan çalışmada uygun erime ısısının 59.3°C olduğu bulunmuştur.....30

Şekil 14. TLR-4 399 primer çiftinin 124 bp büyüklüğündeki PZR ürün allellerinin kontrol grubunda dağılımı %1 lik agaroz jelde görülmektedir. Kontrol grubunda bir uzun ve birde kısa allellerin olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 16. bantda hem kısa hem uzun alleli taşıyan heterozigot yapı görülmüştür.31

Şekil 15. TLR-4 399 primer çiftinin 124 bp lik PZR ürünleri Hinf I ile kesildikten sonra %3 lük agaroz jelde görüntüleri incelendiğinde burada da kısa ve uzun alleller gözlemlenmiştir. 5,8,16,19,21 bantları kısa ve uzun alleller için heterozigot, 7 bant da bir ara allel gözlemlenmiştir.....31

Şekil 16. Hasta grubunda TLR-4 399 primer çiftinin 124 bp lik PZR ürünlerinin %1 lik agaroz jel elektroforezinden sonraki dağılımı görülmektedir. Bir kısım hasta grubu örnek olarak gösterilmekde ve burada da hem uzun hem kısa alleller görülmektedir.....32

Şekil 17. Hasta grubunda TLR-4 399 primer çiftinin 124 bp lik PZR ürünlerinin Hinf I RE enzimiyle kesildikten sonra %3 lük agaroz jel elektroforezinden sonraki dağılımı görülmektedir.Yukarıdaki şekildeki aynı hasta grubun da RE enziminden sonra aynı bantların çıkması hasta gruplarında da hem uzun hem de kısa allellerin varlığı tesbit edilmiştir.Bunlardan 17. bant homozigot kısa allel 14, 16 ve 19. kuyularındaki bantlar heterozigot allel özelliği göstermektedir.32

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleik asit tri fosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eNOS	Endotel nitrik oksit sentetaza
HLA	Human lökosit antijen
HSP	Heat shock protein
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
NaCl	Sodyum klorür
NO	Nitrik oksit
PBL	Peripheral blood lenfosit
PCR	Polimerase chain reaction
RE	Restriction endonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris base etda
TH	T helper hücre
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tümör nekroz faktör
µl	Mikro litre

1.GİRİŞ

Behçet hastalığı tekrarlayan üveit (göz iltihabı) atakları, ağız içi yaraları, genital bölge ülserleri eklem yeri iltihapları ve eritema nodozum ile seyreden, çok nedenli kronik iltihabik bir hastalıktır (1).

Hastalığın sebebi tam olarak aydınlatılmamakla beraber hastalığa viral veya bakteriyel bir enfeksiyonun neden olduğu aynı zamanda direk veya çapraz reaksiyon şeklinde ısı şok proteinleri (heat shock protein 60 = HSP 60) tetikleyici rol oynadığı düşünülmektedir (2,3).

Toll benzeri alıcı proteinlerin (TLR) işlevlerinin aydınlatılmasıyla beraber doğuştan gelen bağışıklık sisteminin (innate immun sistem) bakteri ve virus kökenli antijenleri bu alıcı proteinler sayesinde algılayıp bir takım uyum (adaptör) moleküller üzerinden iltihap tetikleyici (proinflammatory sitokinleri) salgılatarak ilk bağışıklık cevabı başlattığı anlaşılmıştır (4). Şimdiye kadar yapılan araştırmalar Behçet hastalığının T yardımcı hücre1 (T hepler1= Th-1) odaklı ve Th-1 lenfositlerinde İnterleukin1 (IL-1), Tümör nekroz faktör (TNF) sitokinleri tarafından kontrol edildiği düşünüldüğünde bu çalışmada IL-1, TNF uyarılmasını başlatan Toll benzeri alıcı protein-2 (TLR-2) ve/veya Toll bezeri alıcı protein-4 (TLR-4) üzerindeki mutasyonlarının hastalıkla ilişkisi öngörülmüş ve çalışılmıştır. Behçet hastalığının moleküler temellerinin açığa çıkartılması hastalığın bir bütün olarak ele alınıp daha etkin tedavi yöntemleri geliştirilebilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada bilinen TLR-2 Arg677Trp, TLR4 (Asp299Gly , THR399Ile) mutasyonlarının Behçet Hastalığı ile ilişkisi ve var ise bu mutasyonların Behçet hastalarında sıklığının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Behçet hastalığı

Behçet hastalığı sebebi tam olarak anlaşılamamış olup ağız içi aftları, genital bölge yaraları, deri lezyonları ve göz tutulumu ve bazı vakalarda bu belirtilere ek olarak damar ve merkezi sistem tutulumu ile seyreden iltihabik kronik bir hastalıktır (1).

Bu hastalık dünyanın değişik bölgelerinde görülebilmekle beraber en çok, tarihte ipek yolu olarak ifade edilen yol üzerindeki Akdeniz ülkelerinde daha sıklıkla görülmektedir (1). Hastalığın görülme sıklığı Japonyada 15: 100 000 iken en yüksek seviyesine 370: 100 000 ile Türkiyede ulaşır (5,6). Hastalığın sebebi tam olarak aydınlatılmamasına rağmen birtakım genetik yatkınlığı olan insanlarda bazı virus ve bakterilerce hastalığın tetiklendiği düşünülmektedir (7). Genetik olarak HLA-B51 faktörü taşıyan insanların Behçet hastalığına yatkın olduğu bilinmekle beraber HLA-B51 faktörü olmayan insanların Behçet hastalığı taşıdığı gözlemlenmiştir (7).

Bütün bunlar Behçet hastalığının basit bir genetik hastalık olmadığını hastalığın hastalığın bir bakteri virus veya başka bir organizma tarafından tetiklendiğini aynı zamanda hastalığı taşıyanın da genetik olarak bir takım immünolojik bozukluklarının hastalık tablosuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (8).

2.2 Behçet hastalığının klinik özellikleri

2.2.1 Ağız yaraları:

Hemen hemen bütün vakalarda görülen ağız içi yaraları hastalığın ilk işaretidir ve diğer ağız içi yaralarından ayrılabilir (9,10,11).

Bu yaralar çok ağrılı olabilir ve ataklar sırasında yemek yemeyi zorlaştırabilir (12). Yaraların çıkma sıklığı haftalardan aylara uzanabilir (Şekil1) (13).



Şekil 1. Bir Behçet hastasının ağız ve dil bölgesindeki yaralar (13).

2.2.2 Genital bölge yaraları:

Hastaların %80-90 nında ağız yaralarına benzeyen yaralar vardır ve bu yaraların görülme sıklığı ağız yaralarından sonra ikinci sırada yer alır. Erkeklerde skrotumda bayanlarda vulvada yer alır (13).

a



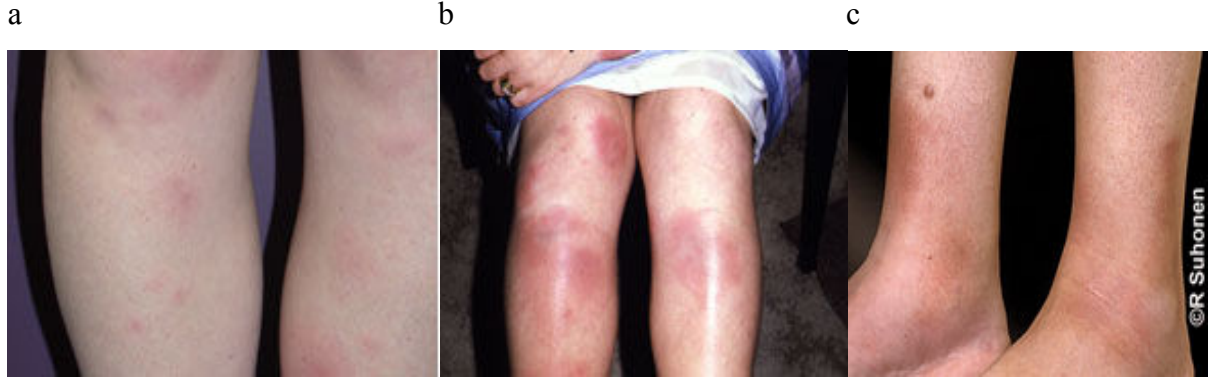
b



Şekil 2. a;Erkek genital bölge yaraları, b;Kadın genital bölge yaraları (13).

2.2.3 Deri lezyonları:

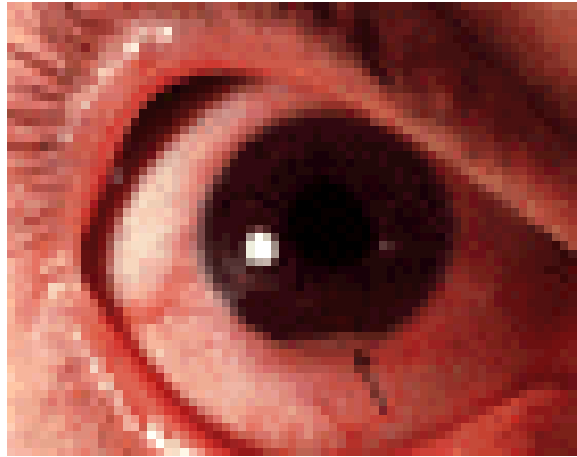
Behçet hastalarının %80 inde değişik deri problemleri hastalık sırasında görülebilir. Bunların en sık rastlanılanı çoğunlukla bayan hastalarda görülen bacağın alt kısmında yumrulu büyüklükler şeklinde olan eritema nodozumdur (12). Şekilde bacağın farklı kısımlarındaki eritema nodozumlar görülmektedir (14).



Şekil 3. a,b,c; çeşitli şiddetde seyreden eritema nodozumlar (14)

2.2.4 Göz tutulumu

Hastalığın başlamasından yaklaşık olarak iki yıl sonra başlayan göz tutulumuna üveit ismi verilir. Üveit behçet hastalarının yaklaşık %50 sinde çoğunluğu erkek olmak üzere gözlenir. Üveit; anterior üveit (ön), intermediate (ara) üveit ve posteriör (arka) üveit olmak üzere üçe ayrılır. Üveitin gözün bütün bölümlerini sardığı şekline pan üveit ismi verilir. (Şekil2) (12). Anterior üveit daha çok bayanlarda gözlenirken pan üveit erkek hastalarda daha çok gözlemlenir (15). Japon ve Türk hastalarda diğer etnik gruplara göre daha sert seyreder (16).



Şekil 4. Pan üveitli bir behçet hastasının gözünün dıştan görünümü (13).

2.3 Tanı

Hastalığa kesin tanı koyulabilmesi için kesin bir test yoktur. Uluslar arası behçet hastalığı çalışma grubunun 1990 yılında belirlediği uluslar arası kriterlere göre tanı konulmaktadır (17). Bu kriterlerin ilki yılda en az üç kere tekrarlayan ağız yaralarıdır(17). Behçet tanısı konabilmesi için bu belirtiye ek olarak major belirtilerden iki belirtiye daha ihtiyaç vardır. Diğer major belirtiler genital bölge yaraları ,göz tutulumu, deri lezyonları ve pozitif paterji testidir (17).

2.4 Tedavi

Hastalığın standart bir tedavisi yoktur. Kullanılan ilaçlar hastalığın semptomlarına ve semptomların şiddetine bağlı olarak değişir (13). Genel olarak kullanılan ilaçlar bağışıklık sistemini baskılayıp hastalığın semptomlarını yavaşlatmak için kullanılan ilaçlardır. Hastalığın değişik semptomları için kullanılan ilaçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

Colchicine: Antimitotik bir ilaçtır. Granulisitlerin iltihap bölgesine göçünü önler ve iltihabik cevapta inhibitör görevi görür. Behçet hastalığının hemen hemen bütün semptomları için kullanılmakla beraber artiritde ve eritema nodozumda daha çok etkilidir (18,19).

Azathioprine: Bir purin analogudur. Purin nükleotidlerin sentezini engellediği ve RNA sentezi ile fonksiyonlarını engellediği için immünbaskılayıcı bir özelliği vardır. Retinal vaskulitlerde ,artiritde, ve ağız ülserlerinde kullanılır. İlaç ağızdan 2.5mg/kg/gün şeklinde alınır. Tedavi başlamadan tam kan sayımı yapılmalı ve karaciğer fonksiyonları test edilmelidir. Tedavi başladıktan sonra ilk bir ay içerisinde tam kansayımı ve karaciğer testleri her hafta yapılmalı , tedavinin sonraki iki ayında bu testler iki haftada bir tekrarlanmalı tedavinin ilk üç aydan sonraki aşamalarında ise bu testler aylık peryotlarla tekrarlanmalıdır (20).

Cyclosporine: T-helper hücre aktivasyonunu engelleyerek birçok sitokin (interleükin 2,3,4, TNF α , interferon γ) sentezini inhibe eden bağışıklık sistemini baskılayan bir ilaçtır. Behçet hastalığında göz tutulumunda kullanılır.Yapılan araştırmalara göre Azathioprine ve Colchicine göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir. 5mg/kilo/gün şeklinde kullanılır. Şiddetli göz tutulumlarında Azathioprine ile beraber kullanılır (21).

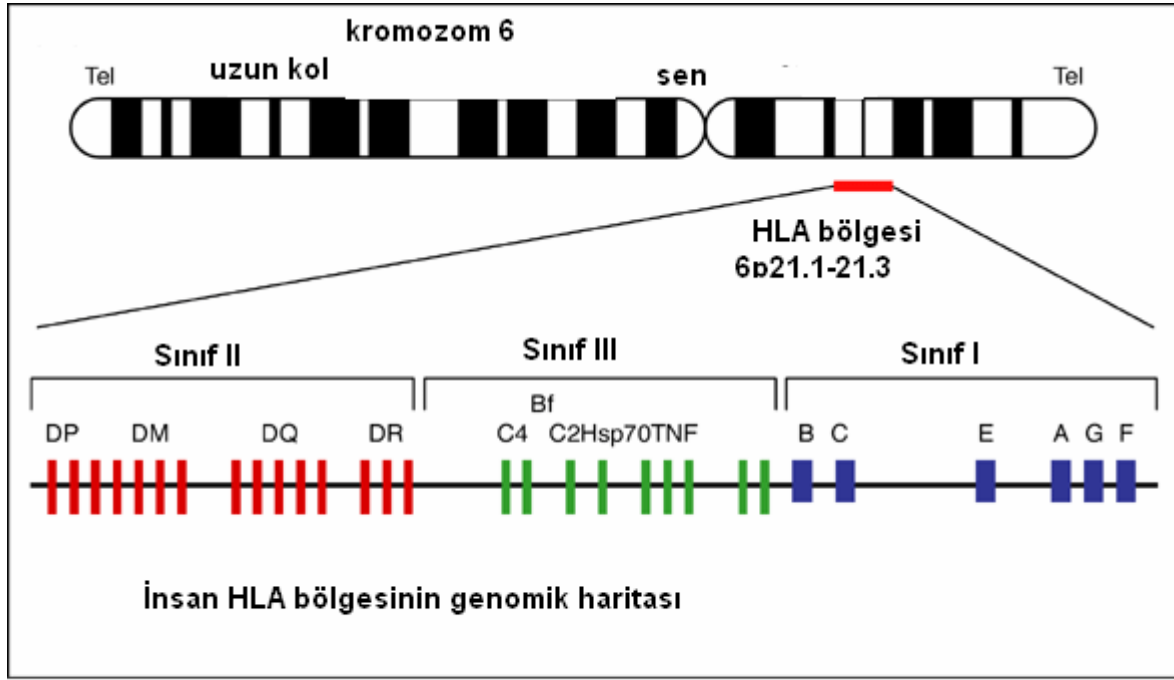
İnterferon alfa: Farklı hücreler tarafından sentezlenen α , β , γ olmak üzere üç farklı interferon çeşidi vardır. Viral RNA ve protein sentezini engellediği için interferon ismini almıştır. İnterferon alfa antiviral ve immün düzenleyici olarak görev yapar. Behçet hastalığında hastalığın gidişatını tam olarak nasıl etkilediği bilinmemekle beraber antiviral etkisi nedeniyle kullanılmaya başlanmıştır. Behçet hastalarında interferon alfa-2a ve alfa -2b kullanılmaktadır. İnterferon alfa-2a'nın daha etkili olduğu rapor edilmektedir. İnterferon tedavisinin üveit ataklarının kontrol altına alınmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Hastaya verilen doz haftada üç kez 6 milyon ünite ile 3 milyon ünite arasında değişmektedir. Depresyon durumunda hastaya verilmemlidir ve interferon alfa'nın bilinen bir ilaç etkileşimi yoktur (22,23,24).

Thalidomide: Thalidomide anti iltihabik, bağışıklık sistem düzenleyici ve antitümör özellikleri olan bir ilaçtır. Otoimmün hastalıklardaki önemi sitokinlerin bir kısmını seçici olarak inhibe etmesine bağlanabilir. TNF leri çok seçici bir şekilde baskılamaktadır. Behçet hastalığında şiddetli seyreden ağız ve genital bölge yaralarında kullanılmaktadır (25).

2.5 Etyoloji

2.5.1 HLA TİPİ

HLA-B51 antijeni hastalıkla en çok ilişkilendirilebilecek genetik marker olarak belirlenmiştir (1,26). HLA genleri 6. kromozomda HLA gen bölgesi üzerinde 3500 kb'ın üzerinde bir alanda dağılmış olarak bulunurlar. HLA-B51 ile Behçet hastalığı arasındaki güçlü ilişki bir çok etnik grupta (Türkler, Yunanlılar, İtalyanlar Fransızlar İngilizler Almanlar, Tunuslular İsraililer, Ürdünlüler, İranlılar, Suudi Arabistanlılar, Kuveytliler, Çinliler, Koreliler, Tayvanlılar ve Japonlar) da teyit edilmiştir. Bununla beraber HLA-B51'in direk olarak mı yoksa onunla ilintili olan bir genin mi Behçet hastalığı için patolojik bir özellik gösterdiği konusu hala araştırılmaktadır (27).



Şekil 5 İnsan lökosit antijen (HLA) bölgesi (28). HLA bölgesi kromozom 6p21.1 –p21.3 bölgesinde yer alıp, sınıf II ve sınıf III genleri uzun kol üzerinde ve sınıf I genleride kısa kol üzerinde yer almaktadır. Sınıf I gen ürünleri CD8 sitotoksit T lenfositlerin fonksiyonlarını sınırlarken organizmaların kendilerine ait olan antijenlere karşı ve virusun bulaştığı hedef hücrelere karşı bağışıklık cevaplarına aracılık eder. Sınıf II HLA molekülleri yabancı antijenlerin T yardımcı hücrelerine sunumuyla ilgilidir. HLA Sınıf III bölgesi hücre aracılığı bağışıklık cevabı ile ilgil olmayan fakat bağışıklık sisteminin uyarlanmasıyla ilgili proteinleri ifade ederler. Ayrıca sınıf III gen ürünleri tümör nekroz faktörü (TNF), ısı şok proteinleri (HSP) ve C2, C4 gibi komplement proteinlerinin uyarlanması veya düzenlenmesinde görev alırlar (Expert Reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University Pres)

2.5.2 Bakteri ve viruslerin hastalıktaki yeri

Behçet hastalığının etyolojisi tam olarak anlaşılmamakla beraber çeşitli bakterilerin ve virüslerin hastalığı tetiklediği düşünülmektedir. Streptokoklardan kaynaklandığı düşünülen ağız yaraları ve diş iltihapları Behçet hastalarında oldukça yüksektir.(29,30)

Yapılan araştırmalarda bir çok hastanın ağız florasında çeşitli streptokok türü bakteriler izole edilmiştir ve izole edilen bu bakteriye karşı gelişen antikorlara rastlanmıştır (31,32,33).

Bir çok araştırmada *Streptococcus mitis* grubu bakterilerin de behçet hastalığıyla ilişkisi belirlenmiştir. Çok sayıda Behçet hastasının ağız florasında sıklıkla bu bakteriye ve bu bakteriye karşı gelişen antikorlara rastlanmıştır (31,32,33). Behçet hastalardan alınan lenfositlerde streptococcal antijenlerine karşı aşırı duyarlıdırlar (34,30). Bunlara ek olarak Behçet hastalarında deri testlerinde (paterji testi) streptococcal antijenlerine karşı alerjik reaksiyon göstermektedir (35). Antibakteriyel tedavinin behçet hastalarında faydalı olması, bakterilerin behçet hastalığındaki rolünü gösteren başka bir araştırmadır (36). Streptokokların bir alt türü olan KTH-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi iltihap öncesi sitokinlerin salgılanmasına neden olmaktadır (37).

Yapılan araştırmalarda Behçet hastalarının serumlarında kontrol gruplarına göre herpes simplex virus DNA sı ve bu viruse karşı gelişen serum antikorları daha yüksek düzeyde belirlenmiştir (38).

Bütün bu araştırmaların sonucunda bu bakterilerde veya viruste bulunan bir antijenle Behçet hastalarında bulunan bir antijen arasında bir çapraz reaksiyon gerçekleştiği ve bunun kronik iltihabı tetiklediği şeklinde bir hipotez ortaya çıkmıştır.(8,39)

2.5.3 Endotel Hücreleri ve Nitrik Oksit

Nitrik oksit endotel hücrelerinin duvarlarında bulunan nitrik oksit sentetaz (eNOS) tarafından L-arjinden üretilir. Bir çok çalışmada eNOS geni içindeki DNA çok yapıllılığı ile vasküler hastalıklar arasında ilişki bulunmuştur (40).

Behçet hastalığı endotel hücre bozukluğu ve vasküitle tanımlanır. Nitrik oksit endotel hücreleri tarafından immunolojik, enfeksiyonel ve iltihabik (sitokin,INF- γ ,liposakkarit,ve endotoksin) uyarıcılarla sentezlenen serbest bir oksijen radikalidir (41,42).

Behçet hastalarında serum nitrite ve nitrat yoğunluklarının NO nun düşüşünde bir gösterge olduğu bulunmuştur (43,44,45). Ayrıca endotel NO sentazda Glu-Asp298 polimorfizminin Behçet hastalığı ile ilişkili olduğuna dair ipuçlarıda bulunmuştur (46,47,48).

2.5.4 HSP (Heat shock proteinlerin) hastalıktaki rolleri

Isı şoku proteinleri (heat shock proteinler) ağırlıklarına göre 6 ana gruba ayrılan stres proteinlerinin süper family grubuna giren bir protein çeşididir. Bu proteinlerin tipik özelliği çeşitli fizyolojik ve duygusal stresler sonucu(yüksek sıcaklık,osmatik basınç,iltihap,UV)yüksek seviyede salgılanmasıdır (49). Bir çok çalışmada ısı şok proteinlerinin Behçet hastalarında birtakım antijen determinantlarının özellikle 336-351 peptitler PBL (peripheral blood lenfosit) leri uyarak aşırı miktarda TH-1 sitokini birikimine neden olduğu

gösterilmiştir (50,51). Bu da self HSP reaktif T hücrelerinin Behçet hastalığının patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir. İnsan HSP 60 ların bir takım antijen determinantlarının bakteri HSP 65 lerle homoloji göstermeleri bakteri ısı şok proteinleri ile insan şok proteinleri arasında çapraz bir reaksiyon gerçekleştiğini ve buda ısı şok proteinleri arasındaki çapraz reaksiyonun olası Behçet hastalığı oluşumu mekanizmalarından biri olduğunu göstermektedir (52).

2.5.5 Toll Benzeri Proteinler ve Görevleri

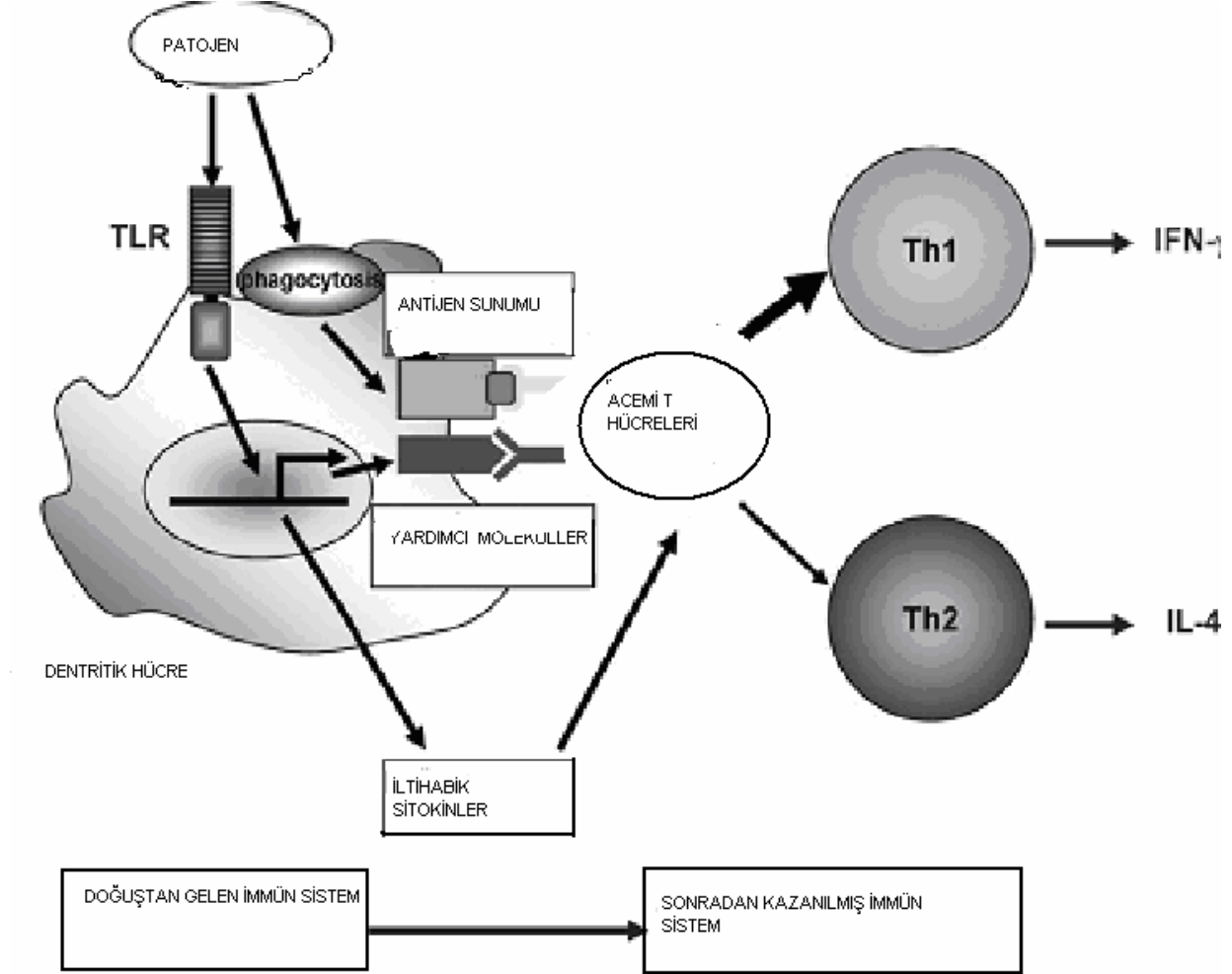
Bağışıklık sisteminin doğuştan gelen bağışıklık sistem (innate) ve edinilmiş bağışıklık sistem (adaptive) adı verilen iki bölümden oluşur (53). Her iki bölümde dışardan gelen mikroorganizmalara karşı bir bağışıklık cevap geliştirilir ve mikroorganizma yok edilmeye çalışılır (53). Her iki sistem de bugüne kadar yapılan bir çok araştırmayla çalışılmış ve özellikle sonradan kazanılan bağışıklık sisteminin B ve T lenfosit gibi elemanlarının özellikleri karakterize edilmiştir(53).

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olan antijen sunucu hücrelerin (makrofaj ve dentritik) yüzeylerinde bulunan toll benzeri alıcı proteinlerin görevlerinin anlaşılmasıyla beraber virus ve bakteri antijenlerinin bu alıcı proteinlerin algılanıp her bir antijen çeşidine çok özel cevaplar şeklinde farklı uyarı iletim mekanizmalarıyla cevap verildiği ispatlanmıştır (54).

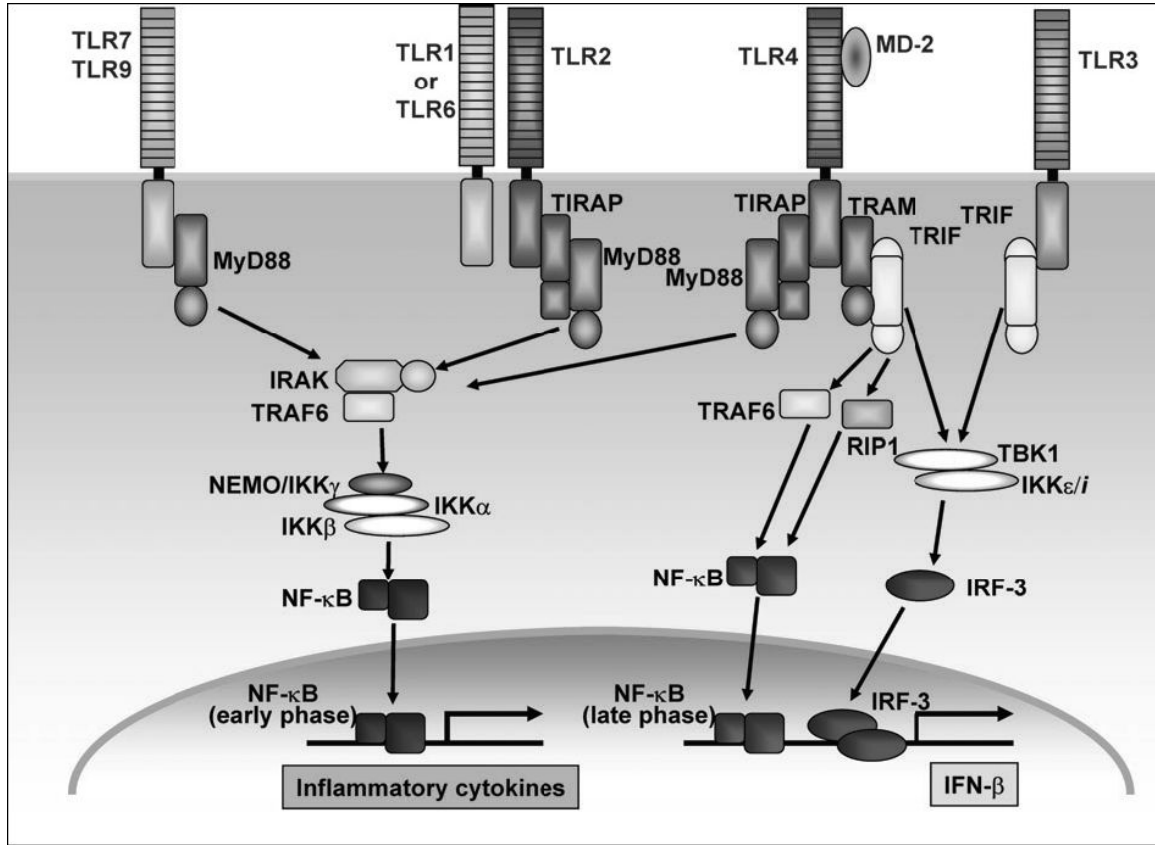
TLR-2 ler çeşitli bakteri ve virüslerin antijenlerini tanırlar (54). Bunlar lipoproteinler ,lipopeptidler ,gram pozitif bakterilerden lipoteykoik asit (lipoteichoic) peptidoglikan (peptidoglycan) lar olarak sıralanabilir (54). TLR-4 ler liposakkarit tanıyan temel alıcı proteinlerdir (54). Bunlara ek olarak HSP 60, HSP 70 gibi içsel ligandların tanınmasında görev aldıkları ispatlanmıştır (54).

Bütün bu bilgiler ışığında Behçet hastalarında streptococcus kokenli bir bakterinin veya herpes simplex virusunun bağışıklık sistemini sürekli uyararak doğuştan gelen immün cevabı etkilediği ve özellikle TLR-2 ve TLR-4 üzerinden algılanan bu organizmalara ait antijenik yapıların iltihap öncesi sitokinlerin(IL-1,IL-6,TNF- α) salınımını aktive ederek ortamdaki olgunlaşmamış (naive) T lenfositleri TH-1'na dönüştürerek TH-1 ağırlıklı bir bağışıklık cevabı ortaya çıkarttığı sonucu rapor edilmiştir. (Şekil 3) (54). Öte taraftan zamanda bakterinin antijenik determinantlarıyla insanın kendi yapısında bulunan HSP lerin antijenlerinin benzerlik göstermesi sonucu bu iki yapı arasında imünolojik çapraz bir reaksiyonun geliştiğini ve de doğuştan gelen immün sistem uyarımlarının zamanla sonradan kazanılan bağışıklık sistemin kontrolüne geçerek ortamda bu bakteri veya virus olmasada

HSP lerin etkisiyle bir immün cevap ortaya çıktığı bilinmekle beraber bu süreçte Behçet hastalığı taşıyan insanlarda kronik iltihap süreci tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 6. TLR lerin innate immün sistemde sinyal mekanizmasını başlatması ve olgunlaşmamış T hücrelerinin ortamdaki sitokinlere göre TH1 veya TH2 ye dönüşümü



Şekil 7. Toll like reseptör ailesine ait değişik grup reseptörlerin iltihap tetikleyici proteinleri sentezletirmesi

2.5.5.1 Toll benzeri alıcı protein2 aminoasit dizilişi

TLR- 2 alıcı proteininin amino asit dizilişi aşağıdaki gibidir.

```

1ATG CCA CAT ACT TTG TGG ATG GTG TGG GTC TTG GGG GTC ATC ATC AGC
  1 Met Pro His Thr Leu Trp Met Val Trp Val Leu Gly Val Ile Ile Ser

49 CTC TCC AAG GAA GAA TCC TCC AAT CAG GCT TCT CTG TCT TGT GAC CGC
17 Leu Ser Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg

97 AAT GGT ATC TGC AAG GGC AGC TCA GGA TCT TTA AAC TCC ATT CCC TCA
33 Asn Gly Ile Cys Lys Gly Ser Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ile Pro Ser

145 GGG CTC ACA GAA GCT GTA AAA AGC CTT GAC CTG TCC AAC AAC AGG ATC
49 Gly Leu Thr Glu Ala Val Lys Ser Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Ile

193 ACC TAC ATT AGC AAC AGT GAC CTA CAG AGG TGT GTG AAC CTC CAG GCT
65 Thr Tyr Ile Ser Asn Ser Asp Leu Gln Arg Cys Val Asn Leu Gln Ala

```

241 CTG GTG CTG ACA TCC AAT GGA ATT AAC ACA ATA GAG GAA GAT TCT TTT
 81 Leu Val Leu Thr Ser Asn Gly Ile Asn Thr Ile Glu Glu Asp Ser Phe

289 TCT TCC CTG GGC AGT CTT GAA CAT TTA GAC TTA TCC TAT AAT TAC TTA
 97 Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Tyr Leu

337 TCT AAT TTA TCG TCT TCC TGG TTC AAG CCC CTT TCT TCT TTA ACA TTC
 113 Ser Asn Leu Ser Ser Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ser Ser Leu Thr Phe

385 TTA AAC TTA CTG GGA AAT CCT TAC AAA ACC CTA GGG GAA ACA TCT CTT
 129 Leu Asn Leu Leu Gly Asn Pro Tyr Lys Thr Leu Gly Glu Thr Ser Leu

433 TTT TCT CAT CTC ACA AAA TTG CAA ATC CTG AGA GTG GGA AAT ATG GAC
 145 Phe Ser His Leu Thr Lys Leu Gln Ile Leu Arg Val Gly Asn Met Asp

481 ACC TTC ACT AAG ATT CAA AGA AAA GAT TTT GCT GGA CTT ACC TTC CTT
 161 Thr Phe Thr Lys Ile Gln Arg Lys Asp Phe Ala Gly Leu Thr Phe Leu

529 GAG GAA CTT GAG ATT GAT GCT TCA GAT CTA CAG AGC TAT GAG CCA AAA
 177 Glu Glu Leu Glu Ile Asp Ala Ser Asp Leu Gln Ser Tyr Glu Pro Lys

577 AGT TTG AAG TCA ATT CAG AAT GTA AGT CAT CTG ATC CTT CAT ATG AAG
 193 Ser Leu Lys Ser Ile Gln Asn Val Ser His Leu Ile Leu His Met Lys

625 CAG CAT ATT TTA CTG CTG GAG ATT TTT GTA GAT GTT ACA AGT TCC GTG
 209 Gln His Ile Leu Leu Leu Glu Ile Phe Val Asp Val Thr Ser Ser Val

673 GAA TGT TTG GAA CTG CGA GAT ACT GAT TTG GAC ACT TTC CAT TTT TCA
 225 Glu Cys Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asp Leu Asp Thr Phe His Phe Ser

721 GAA CTA TCC ACT GGT GAA ACA AAT TCA TTG ATT AAA AAG TTT ACA TTT
 241 Glu Leu Ser Thr Gly Glu Thr Asn Ser Leu Ile Lys Lys Phe Thr Phe

769 AGA AAT GTG AAA ATC ACC GAT GAA AGT TTG TTT CAG GTT ATG AAA CTT
 257 Arg Asn Val Lys Ile Thr Asp Glu Ser Leu Phe Gln Val Met Lys Leu

817 TTG AAT CAG ATT TCT GGA TTG TTA GAA TTA GAG TTT GAT GAC TGT ACC
 273 Leu Asn Gln Ile Ser Gly Leu Leu Glu Leu Glu Phe Asp Asp Cys Thr

865 CTT AAT GGA GTT GGT AAT TTT AGA GCA TCT GAT AAT GAC AGA GTT ATA
 289 Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile

913 GAT CCA GGT AAA GTG GAA ACG TTA ACA ATC CGG AGG CTG CAT ATT CCA
 305 Asp Pro Gly Lys Val Glu Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro

961 AGG TTT TAC TTA TTT TAT GAT CTG AGC ACT TTA TAT TCA CTT ACA GAA

321 Arg Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Glu

1009 AGA GTT AAA AGA ATC ACA GTA GAA AAC AGT AAA GTT TTT CTG GTT CCT
337 Arg Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro

1057 TGT TTA CTT TCA CAA CAT TTA AAA TCA TTA GAA TAC TTG GAT CTC AGT
353 Cys Leu Leu Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser

1105 GAA AAT TTG ATG GTT GAA GAA TAC TTG AAA AAT TCA GCC TGT GAG GAT
369 Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp

1153 GCC TGG CCC TCT CTA CAA ACT TTA ATT TTA AGG CAA AAT CAT TTG GCA
385 Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala

1201 TCA TTG GAA AAA ACC GGA GAG ACT TTG CTC ACT CTG AAA AAC TTG ACT
401 Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
Ile

1249 AAC ATT GAT ATC AGT AAG AAT AGT TTT CAT TCT ATG CCT GAA ACT TGT
417 Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys

1297 CAG TGG CCA GAA AAG ATG AAA TAT TTG AAC TTA TCC AGC ACA CGA ATA
433 Gln Trp Pro Glu Lys Met Lys Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Arg Ile

1345 CAC AGT GTA ACA GGC TGC ATT CCC AAG ACA CTG GAA ATT TTA GAT GTT
449 His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val

1393 AGC AAC AAC AAT CTC AAT TTA TTT TCT TTG AAT TTG CCG CAA CTC AAA
465 Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys

1441 GAA CTT TAT ATT TCC AGA AAT AAG TTG ATG ACT CTA CCA GAT GCC TCC
481 Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser

1489 CTC TTA CCC ATG TTA CTA GTA TTG AAA ATC AGT AGG AAT GCA ATA ACT
497 Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr

1537 ACG TTT TCT AAG GAG CAA CTT GAC TCA TTT CAC ACA CTG AAG ACT TTG
513 Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu

1585 GAA GCT GGT GGC AAT AAC TTC ATT TGC TCC TGT GAA TTCTCT TCC TTC
529 Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe

1633 ACT CAG GAG CAG CAA GCA CTG GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG CCA GCA
545 Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Thr
Thr

1681 AAT TAC CTG TGT GAC TCT CCA TCC CAT GTG CGT GGC CAG CAG GTT CAG
561 Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln

1729 GAT GTC CGC CTC TCG GTG TCG GAA TGT CAC AGG ACA GCA CTG GTG TCT
 577 Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser
His

1777 GGC ATG TGC TGT GCT CTG TTC CTG CTG ATC CTG CTC ACG GGG GTC CTG
 593 Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu

1825 TGC CAC CGT TTC CAT GGC CTG TGG TAT ATG AAA ATG ATG TGG GCC TGG
 609 Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp Tyr Met Lys Met Met Trp Ala Trp

1873 CTC CAG GCC AAA AGG AAG CC AGG AAA GCT CCC AGC AGG AAC ATC TGC
 625 Leu Gln Ala Lys Arg Lys Pro Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asn Ile Cys
His

1921 TAT GAT GCA TTT GTT TCT TAC AGT GAG CGG GAT GCC TAC TGG GTG GAG
 641 Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ser Glu Arg Asp Ala Tyr Trp Val Glu

1969 AAC CTT ATG GTC CAG GAG CTG GAG AAC TTC AAT CCC CCC TTC AAG TTG
 657 Asn Leu Met Val Gln Glu Leu Glu Asn Phe Asn Pro Pro Phe Lys Leu

2017 TGT CTT CAT AAG CGG GAC TTC ATT CCT GGC AAG TGG ATC ATT GAC AAT
 673 Cys Leu His Lys Arg Asp Phe Ile Pro Gly Lys Trp Ile Ile Asp Asn

2065 ATC ATT GAC TCC ATT GAA AAG AGC CAC AAA ACT GTC TTT GTG CTT TCT
 689 Ile Ile Asp Ser Ile Glu Lys Ser His Lys Thr Val Phe Val Leu Ser

2113 GAA AAC TTT GTG AAG AGT GAG TGG TGC AAG TAT GAA CTG GAC TTC TCC
 705 Glu Asn Phe Val Lys Ser Glu Trp Cys Lys Tyr Glu Leu Asp Phe Ser
Lys

2161 CAT TTC CGT CTT TTT GAT GAG AAC AAT GAT GCT GCC ATT CTC ATT CTT
 721 His Phe Arg Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asp Ala Ala Ile Leu Ile Leu

2209 CTG GAG CCC ATT GAG AAA AAA GCC ATT CCC CAG CGC TTC TGC AAG CTG
 737 Leu Glu Pro Ile Glu Lys Lys Ala Ile Pro Gln Arg Phe Cys Lys Leu

2257 CGG AAG ATA ATG AAC ACC AAG ACC TAC CTG GAG TGG CCC ATG GAC GAG
 753 Arg Lys Ile Met Asn Thr Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Met Asp Glu
Gln Asp

2305 GCT CAG CGG GAA GGA TTT TGG GTA AAT CTG AGA GCT GCG ATA AAG TCC
 769 Ala Gln Arg Glu Gly Phe Trp Val Asn Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ser

2353 TAG
 785 **END** .
 (55)

2.5.5.2 Toll benzeri alıcı proteinin4 aminoasit dizilişi

TLR-4 alıcı proteininin aminoasit dizilişi aşağıdaki gibidir.

```
1 ATG ATG TCT GCC TCG CGC CTG GCT GGG ACT CTG ATC CCA GCC ATG GCC
  1 Met Met Ser Ala Ser Arg Leu Ala Gly Thr Leu Ile Pro Ala Met Ala

49 TTC CTC TCC TGC GTG AGA CCA GAA AGC TGG GAG CCC TGC GTG GAG GTG
17 Phe Leu Ser Cys Val Arg Pro Glu Ser Trp Glu Pro Cys Val Glu Val

97 GTT CCT AAT ATT ACT TAT CAA TGC ATG GAG CTG AAT TTC TAC AAA ATC
33 Val Pro Asn Ile Thr Tyr Gln Cys Met Glu Leu Asn Phe Tyr Lys Ile

145 CCC GAC AAC CTC CCC TTC TCA ACC AAG AAC CTG GAC CTG AGC TTT AAT
49 Pro Asp Asn Leu Pro Phe Ser Thr Lys Asn Leu Asp Leu Ser Phe Asn

193 CCC CTG AGG CAT TTA GGC AGC TAT AGC TTC TTC AGT TTC CCA GAA CTG
65 Pro Leu Arg His Leu Gly Ser Tyr Ser Phe Phe Ser Phe Pro Glu Leu

241 CAG GTG CTG GAT TTA TCC AGG TGT GAA ATC CAG ACA ATT GAA GAT GGG
81 Gln Val Leu Asp Leu Ser Arg Cys Glu Ile Gln Thr Ile Glu Asp Gly

289 GCA TAT CAG AGC CTA AGC CAC CTC TCT ACC TTA ATA TTG ACA GGA AAC
97 Ala Tyr Gln Ser Leu Ser His Leu Ser Thr Leu Ile Leu Thr Gly Asn

337 CCC ATC CAG AGT TTA GCC CTG GGA GCC TTT TCT GGA CTA TCA AGT TTA
113 Pro Ile Gln Ser Leu Ala Leu Gly Ala Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu

385 CAG AAG CTG GTG GCT GTG GAG ACA AAT CTA GCA TCT CTA GAG AAC TTC
129 Gln Lys Leu Val Ala Val Glu Thr Asn Leu Ala Ser Leu Glu Asn Phe

433 CCC ATT GGA CAT CTC AAA ACT TTG AAA GAA CTT AAT GTG GCT CAC AAT
145 Pro Ile Gly His Leu Lys Thr Leu Lys Glu Leu Asn Val Ala His Asn

481 CTT ATC CAA TCT TTC AAA TTA CCT GAG TAT TTT TCT AAT CTG ACC AAT
161 Leu Ile Gln Ser Phe Lys Leu Pro Glu Tyr Phe Ser Asn Leu Thr Asn
      Ala

529 CTA GAG CAC TTG GAC CTT TCC AGC AAC AAG ATT CAA AGT ATT TAT TGC
177 Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Ser Ile Tyr Cys
      Arg

577 ACA GAC TTG CGG GTT CTA CAT CAA ATG CCC CTA CTC AAT CTC TCT TTA
193 Thr Asp Leu Arg Val Leu His Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu
```

625 GAC CTG TCC CTG AAC CCT ATG AAC TTT ATC CAA CCA GGT GCA TTT AAA
 209 Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys

673 GAA ATT AGG CTT CAT AAG CTG ACT TTA AGA AAT AAT TTT GAT AGT TTA
 225 Glu Ile Arg Leu His Lys Leu Thr Leu Arg Asn Asn Phe Asp Ser Leu

721 AAT GTA ATG AAA ACT TGT ATT CAA GGT CTG GCT GGT TTA GAA GTC CAT
 241 Asn Val Met Lys Thr Cys Ile Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His
Ser

769 CGT TTG GTT CTG GGA GAA TTT AGA AAT GAA GGA AAC TTG GAA AAG TTT
 257 Arg Leu Val Leu Gly Glu Phe Arg Asn Glu Gly Asn Leu Glu Lys Phe

817 GAC AAA TCT GCT CTA GAG GGC CTG TGC AAT TTG ACC ATT GAA GAA TTC
 273 Asp Lys Ser Ala Leu Glu Gly Leu Cys Asn Leu Thr Ile Glu Glu Phe

865 CGA TTA GCA TAC TTA GAC TAC TAC CTC GAT GAT ATT ATT GAC TTA TTT
 289 Arg Leu Ala Tyr Leu Asp Tyr Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Asp Leu Phe
Gly

913 AAT TGT TTG ACA AAT GTT TCT TCA TTT TCC CTG GTG AGT GTG ACT ATT
 305 Asn Cys Leu Thr Asn Val Ser Ser Phe Ser Leu Val Ser Val Thr Ile
Trp Gly

961 GAA AGG GTA AAA GAC TTT TCT TAT AAT TTC GGA TGG CAA CAT TTA GAA
 321 Glu Arg Val Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Phe Gly Trp Gln His Leu Glu

1009 TTA GTT AAC TGT AAA TTT GGA CAG TTT CCC ACA TTG AAA CTC AAA TCT
 337 Leu Val Asn Cys Lys Phe Gly Gln Phe Pro Thr Leu Lys Leu Lys Ser
Tyr

1057 CTC AAA AGG CTT ACT TTC ACT TCC AAC AAA GGT GGG AAT GCT TTT TCA
 353 Leu Lys Arg Leu Thr Phe Thr Ser Asn Lys Gly Gly Asn Ala Phe Ser

1105 GAA GTT GAT CTA CCA AGC CTT GAG TTT CTA GAT CTC AGT AGA AAT GGC
 369 Glu Val Asp Leu Pro Ser Leu Glu Phe Leu Asp Leu Ser Arg Asn Gly

1153 TTG AGT TTC AAA GGT TGC TGT TCT CAA AGT GAT TTT GGG ACA ACC AGC
 385 Leu Ser Phe Lys Gly Cys Cys Ser Gln Ser Asp Phe Gly Thr Thr Ser
Phe Ile Asn

1201 CTA AAG TAT TTA GAT CTG AGC TTC AAT GGT GTT ATT ACC ATG AGT TCA
 401 Leu Lys Tyr Leu Asp Leu Ser Phe Asn Gly Val Ile Thr Met Ser Ser

1249 AAC TTC TTG GGC TTA GAA CAA CTA GAA CAT CTG GAT TTC CAG CAT TCC
 417 Asn Phe Leu Gly Leu Glu Gln Leu Glu His Leu Asp Phe Gln His Ser

1297 AAT TTG AAA CAA ATG AGT GAG TTT TCA GTA TTG CTA TCA CTC AGA AAC
 433 Asn Leu Lys Gln Met Ser Glu Phe Ser Val Phe Leu Ser Leu Arg Asn

1345 CTC ATT TAC CTT GAC ATT TCT CAT ACT CAC ACC AGA GTT GCT TTC AAT

Arg

2113 CTC TGC CTT CAC TAC AGA GAC TTT ATT CCC GGT GTG GCC ATT GCT GCC
705 Leu Cys Leu His Tyr Arg Asp Phe Ile Pro Gly Val Ala Ile Ala Ala

2161 AAC ATC ATC CAT GAA GGT TTC CAT AAA AGC CGA AAG GTG ATT GTT GTG
721 Asn Ile Ile His Glu Gly Phe His Lys Ser Arg Lys Val Ile Val Val

2209 GTG TCC CAG CAC TTC ATC CAG AGC CGC TGG TGT ATC TTT GAA TAT GAG
737 Val Ser Gln His Phe Ile Gln Ser Arg Trp Cys Ile Phe Glu Tyr Glu

2257 ATT GCT CAG ACC TGG CAG TTT CTG AGC AGT CG T GCT GGT ATC ATC TTC
753 Ile Ala Gln Thr Trp Gln Phe Leu Ser Ser Arg Ala Gly Ile Ile Phe
His

2305 ATT GTC CTG CAG AAG GTG GAG AAG ACC CTG CTC AGG CAG CAG GTG GAG
769 Ile Val Leu Gln Lys Val Glu Lys Thr Leu Leu Arg Gln Gln Val Glu

2353 CTG TAC CGC CTT CTC AGC AGG AAC ACT TAC CTG GAG TGG GAG GAC AGT
785 Leu Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Glu Asp Ser

2401 GTC CTG GGG CGG CAC ATC TTC TGG AGA CGA CTC AGA AAA GCC CTG CTG
801 Val Leu Gly Arg His Ile Phe Trp Arg Arg Leu Arg Lys Ala Leu Leu

2449 GAT GGT AAA TCA TGG AAT CCA GAA GGA ACA GTG GGT ACA GGA TGC AAT
817 Asp Gly Lys Ser Trp Asn Pro Glu Gly Thr Val Gly Thr Gly Cys Asn

2497 TGG CAG GAA GCA ACA TCT ATC TGA
833 Trp Gln Glu Ala Thr Ser Ile **END** ... (55) .
Lys

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kan Örneklerinin Eldesi

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji polikliniğinde etik kurul kararında sonra Uluslararası Behçet çalışma grubunun kriterlerine göre 75 Behçet hastasının kanı ile herhangi bir hastalığı olmayan 30 sağlıklı bireyden alınan kanlar kullanıldı.

Her iki gruptaki bireylerden, DNA eldesi için kullanılmak üzere EDTA'lı tüpe 5'er mL kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar DNA eldesine kadar geçen süre içinde -20 °C'de saklandı.

3.2. Gereçler

Derin dondurucu (Bosh, İstanbul, Türkiye),mikrosantrifüj (Eppendorf, Hamburg, Almanya), PCR aleti (MJ Research, Boston, Amerika) mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul, Türkiye), hassas terazi (Shimadzu, Kyoto, Japonya), santrifüj (Eppendorf, Hamburg, Almanya), mikropipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya), manyetik karıştırıcı (Velp, Scientifica, İtalya), vorteks (Nüve, İstanbul, Türkiye), biyolojik emniyet kabini (Bilser, İstanbul, Türkiye), düşük basınçlı kurutucu (El yapımı).

3.2.1. Kimyasal maddeler

Etil alkol (Tekel, İstanbul, Türkiye), Üre (Merck ,Darmstadt, Almanya), Proteinaz K (Sigma, St Louis, Amerika), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, St Louis, Amerika), NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Agaroz (Prona, Madrid, İspanya), EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10X Amonyum sülfatlı PCR tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya), MgCl₂ (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

3.2.2 Çözeltiler

10X TBE (108 g tris-Base, 55 g borik asit, 8,3 g EDTA)

Parçalama çözeltisi (300 mM NaCl , 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl)

Üreli parçalama çözeltisi (4,2 g üre, 10 ml su, 1 ml parçalama çözeltisi)

3.3 DNA Eldesi

1. gün

EDTA lı tüpde izolasyon gününe kadar derin dondurucuda bekleyen kanlar oda sıcaklığına gelmesi sağlandıktan sonra üzerlerine hacimleri kadar saf su eklendi. Yeteri kadar altüst edildikten sonra 4000 devir/dakikada 25 dakika santrifüj edildi ve üst kısımda kalan sıvı atıldı. Bu işlem üç kere devam edildi. Üçüncü santrifüjün sonra yine üst kısımdaki sıvı kısım atıldıktan sonra 3 mL üreli parçalama çözeltisi eklendi ve çökeleğin tam olarak çözünmesi sağlandı. Ardından 400 µl %20 lik SDS ve 100 µl 10 mg/mL proteinaz K eklenerek 37 °C’ de 1 gece inkübasyona bırakıldı (56).

2.gün

İnkübasyondan çıkarılan örnekler 2 mL 5M NaCl eklendi ve yaklaşık 15 dakika altüst edildi. Daha sonra üzerlerine 8 mL kloroform konularak 4000 devir/dakika 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan üç fazdan üsteki kısım temiz bir tüpe alınarak ,üzerine hacmi kadar soğuk %96 lık etil alkol eklendi. Alkol ilavesi ile çöken DNA lar pipet ucu ile 1,5 mL lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µl %70 lik etil alkol eklendi. Tüpler 13000 devir/dakika’ da 10 dakika santrifüj edilerek DNA’ların tüpün dibine yapışması sağlandı . Bu işlem 3 kez tekrar edildi. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde döküldü. Tüplerin dibine yapışması sağlanan DNA lar vakumlu kurutucuda yarım saat bekletildi ve üzerlerine gerekli miktarda deiyonize steril su eklendi. Bir gün +4 °C’ de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA lar saklanmak üzere -20 °C’ lik derin dondurucuya kaldırıldı (56).

3.4. PCR ile, ilgili dizilerinin çoğaltılması

Bu çalışmada DNA analizi için kullanılan PZR (PZR= polimeraz zincir reaksiyonu veya PCR= polymerase Chain Reaction) tekniği, istenen gen bölgesinin canlı dışı ortamda çoğaltılmasına dayanan uygulanabilirliği ve pratikliği ile günümüzde moleküler biyoloji çalışmalarında en sık kullanılan tekniklerden biridir (57).

Toll like reseptör 4 ve Toll like reseptör 2 deki ilgilenilen gen bölgelerinin çoğaltılması MJ Research PTC-200 PCR cihazı ile yapıldı. PZR tepkimesi için gerekli karışımlar steril kabinde otoklavlanmış malzemelerle hazırlandı.

3.4.1 Kullanılan Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler Sanchez (2004) ve Folwaczny arkadaşlarının çalışmalarından alınmıştır.

Özellikleri ve gen dizilişleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 1. Kullanılan primerler ve özellikleri (Sanchez E. ve arkadaşları. Polymorphism of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus Tissue Antigens, 63: 54-57, 2004 ve M.Folwaczny ve arkadaşları. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 in periodontal disease. Clinical & Experimental Immunology, 135: 330-335, 2004).

Primer uzunluğu (nt)	Nükleotid dizisi	Ürün (baz çift)	mutasyon
23 20	5'- CCTTCAAGTTGTGTCTTCATAAC -3' 5'- GGCCACTCCAGGTAGGTCTT -3'	289 bç	Tlr 2 677
26 24 31 31	5'- AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG -3' 5'- GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG -3' 5'- GGTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA -3' 5'- GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC- 3'	188 bç 124 bç	Tlr4 299 Tlr4 399

3.4.2 . Çalışılan Bölgelere göre PCR kimyasallar protokolleri

Tablo2 TLR2 Arg677Trp için PCR kimyasallar protokolü

10XPCR Buffer	2,5 µl
dNTPs (1.25 mM)	1,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	16,8 µl
İleri Primer	0,3 µl
Geri Primer	0,3 µl
Taq DNA polimeraz	0,1 µl
Hedef DNA (stoktan seyreltilmiş DNA)	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3. Tlr4 Asp299Gly için PCR kimyasallar protokolü.

10XPCR Buffer	2,5 µl
dNTPs (1.25 mM)	1,25 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	17,6 µl
İleri Primer	0,1 µl
Geri Primer	0,1 µl
Taq DNA polimeraz	0,15 µl
Hedef DNA (stoktan seyreltilmiş DNA)	0,8 µl
Toplam	25 µl

Tablo 4. Tlr4 Thr399Ile için PCR kimyasallar protokolü.

10XPCR Buffer	2,5 µl
dNTPs (1.25 mM)	1,25 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	18,4 µl
İleri Primer	0,2 µl
Geri Primer	0,2 µl
Taq DNA polimeraz	0,15 µl
Hedef DNA (stoktan seyreltilmiş DNA)	0,8 µl
Toplam	25 µl

3.4.3 Çalışılan bölgelere göre thermal cyclers zaman ısı protokolleri

Tablo 5. TLR2 Arg677Trp için PSR zaman-ısı protokolü. Denatürasyon, Yapışma ve Uzama basamakları 35 döngü halinde yapıldı.

İlk denatürasyon	95 °C	4dak.
Denatürasyon	95 °C	30sn
Yapışma	58°C	30 sn
Uzama	72 °C	30sn .
Son uzama	72 °C	5 dak.

Tablo 6. Tlr4 Asp299Gly için PCR zaman-ısı protokolü. Denatürasyon, Yapışma ve Uzama basamakları 35 döngü halinde yapıldı.

İlk denatürasyon	95 °C	4dak.
Denatürasyon	94 °C	1dak.
Yapışma	61°C	45sn .
Uzama	72 °C	1dak.
Son uzama	72 °C	5 dak.

Tablo7. Tlr4 Thr399Ile için PCR zaman-ısı protokolü. Denatürasyon, Yapışma ve Uzama basamakları 35 döngü halinde yapıldı.

İlk denatürasyon	94 °C	5dak.
Denatürasyon	94 °C	1dak.
Yapışma	59.3°C	45sn .
Uzama	72 °C	1 dak.
Son uzama	72 °C	5 dak.

3.5 Restriksiyon enzimi ile kesim

3.5.1. Restriksiyon enzimi ile kesim Protokolleri

Tablo 8. MspI için RE Kesim Protokolü.

10XRE Buffer	2 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	0.75 µl
BSA (Bovine serum albumin)	2 µl
RE MspI	0,25 µl
Toplam	5µl

Tablo 9. Hinf I RE protokolü

10XRE Buffer	2 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	0.75 µl
BSA (Bovine serum albumin)	2 µl
Hinf I RE	0,25 µl
Toplam	5 µl

Tablo 10. NcoI ile RE protokolü.

10XRE Buffer	2 µl
Deiyonize su (dH ₂ O)	0.75 µl
BSA (Bovine serum albumin)	2 µl
RE Nco I	0,25 µl
Toplam	5 µl

3.6. AgaroZ Jelin Hazırlanması ve RE'ne maruz bırakılan PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCR sonunda elde edilen ürünlerin gözle görünür hale gelebilmesi için içerisinde etidyum bromid bulunan % 2'lik agaroz jeller kullanıldı.

Hassas terazide tartılan 1.6 g agaroz ısıya dayanıklı bir beher içerisine alındı. Üzerine 80 ml 1xTBE tampon solüsyonu ilave edildi. AgaroZ tampon solüsyon içerisinde çözülene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Mikrodalga fırından alınan beher içerisindeki sıvıya soğumasına yakın yaklaşık olarak 65 °C'de 5µl EtBr ilave edildi ve önceden hazırlanmış olan jel tankına döküldü. Tarak yerleştirildikten sonra jel donmaya bırakıldı. Jelin donmasını takiben jel elektroforez tankına yerleştirilip üzerine 1xTBE tampon çözeltisi ilave edildikten sonra tarak çıkartıldı ve üzerlerine yükleme boyası eklenen PCR ürünleri her bir kuyucuğa ayrı ayrı yüklendi.

3.6.1. Elektroforez Koşulları

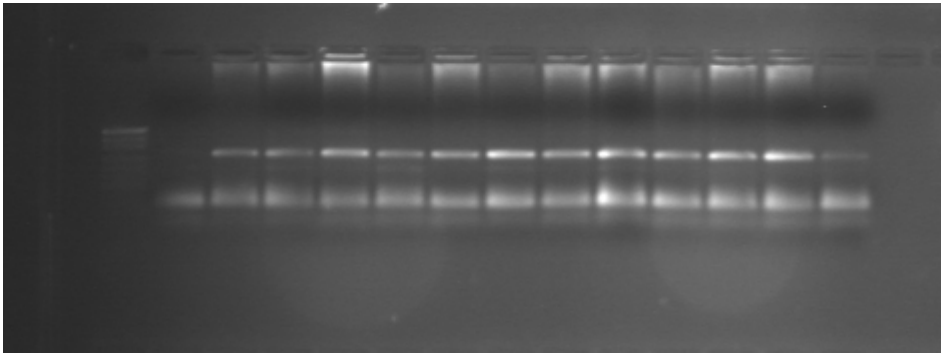
İçerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilen jele örneklerin uygulanması yapıldıktan sonra aşağıdaki şartlar uygulandı:

Elektroforez güç kaynağının 100 volta sabitlendikten sonra 35 dakika yürütüldü. Elektroforez sonlandırıldıktan sonra jel, görüntüleme sisteminde tespit edildikten sonra bulgular değerlendirildi.

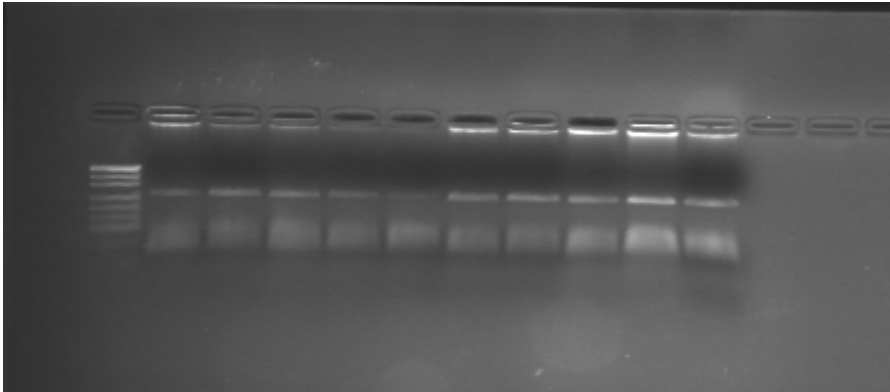
Elektroforez bitiminde jel, görüntüleme sistemine alınarak ultraviyole ışığı altında DNA bantları incelendi.

4. BULGULAR VE SONUÇLAR

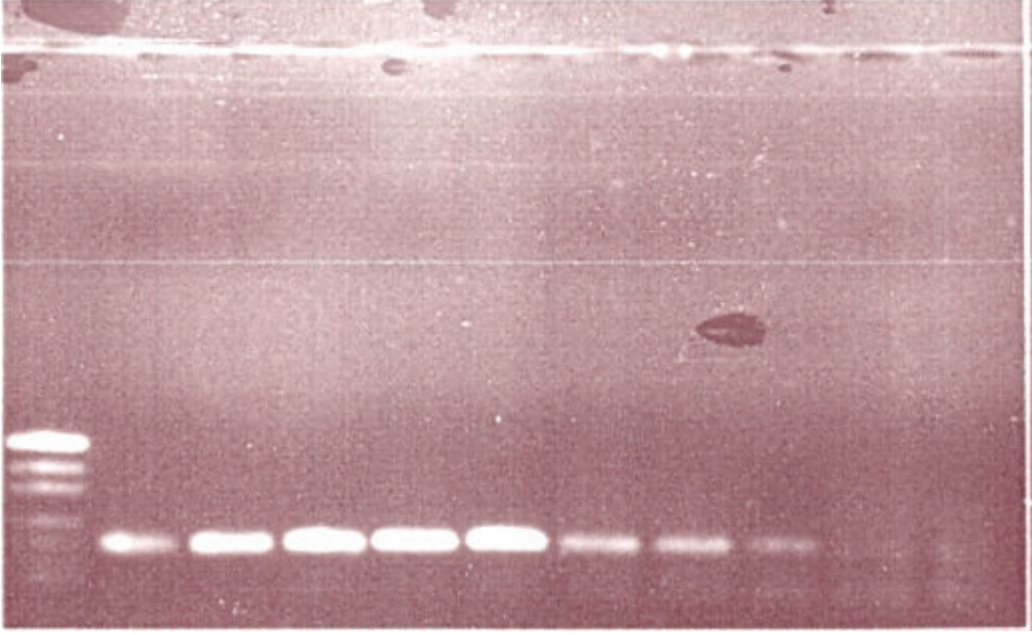
Çalışmamızda 75 bireyden alınan kanlardan tuz çöktürme yöntemiyle DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar primer kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılıp % 2'lik agaroz jel elektroforezi üzerinde puc19 mspI ile kesilen DNA merdiveni (DNA Ladder) temel alınarak analiz edildi. Elektroforez sonucunda oluşan ürün büyüklükleri hesaplandı. Ürün büyüklüklerinin TLR2 primeri için 289 bp, TLR-4 Asp 299Gly için 188 bp ve TLR-4 Thr399Ile için 124 bp bulundu.



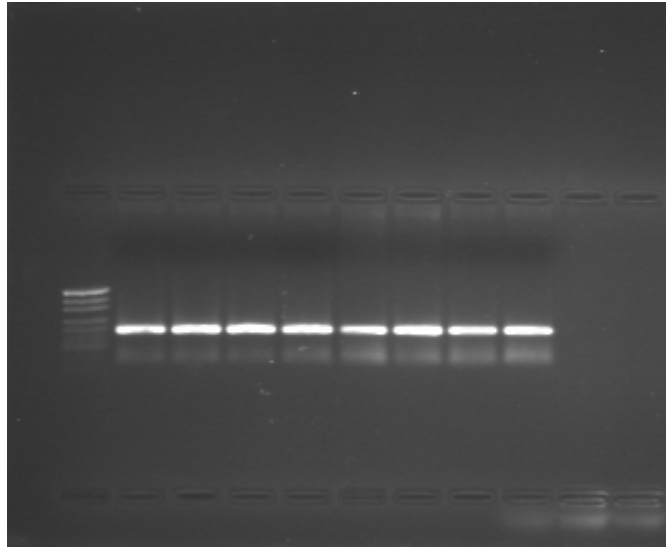
Şekil 8. Kesim öncesi TLR-2 289 bp büyüklükte olduğu şekilden anlaşılmaktadır. Burada hepsi gösterilmemekle beraber farklı uzunlukta bir bant gözlenmemiştir.



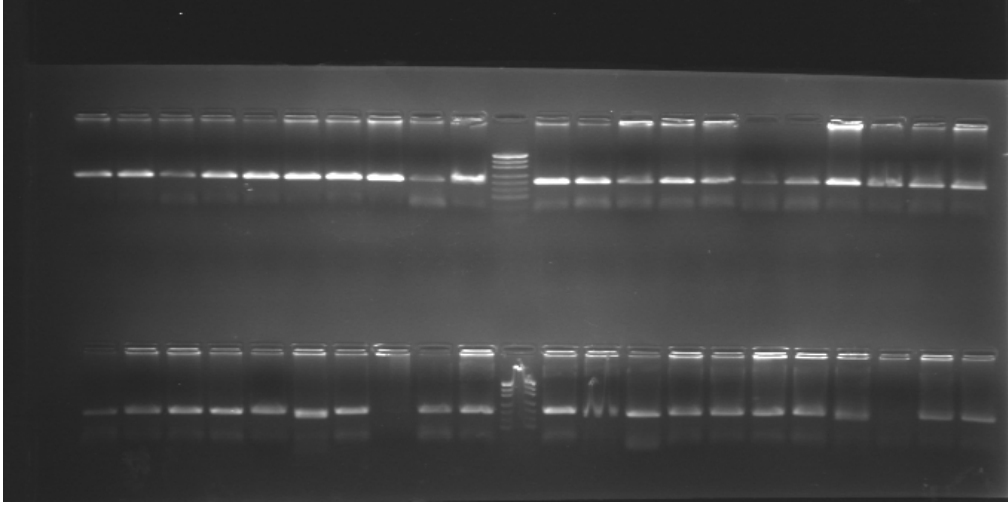
Şekil 9. MspI RE Kesiminden sonra TLR-2 bandı 289 bp lik büyüklükte bir değişim gözlenmediğinden bu gen bölgesi için bir mutasyona rastlanmamıştır.



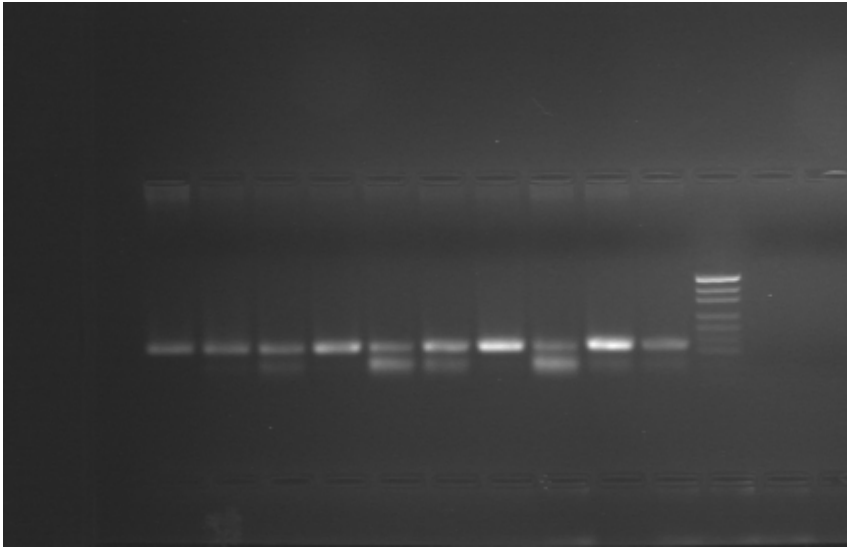
Şekil 10. TLR-4 299 primer çiftinin uygun PZR koşullarını ortaya koymak için uygun erime sıcaklığının kademeli olarak tayin edilmesi. Bu çalışmada en parlak 4. bantın (62°C) olduğu tesbit edilmiş ve bu primer çiftiyle yapılan çalışmalarda 62 °C kullanılmıştır.



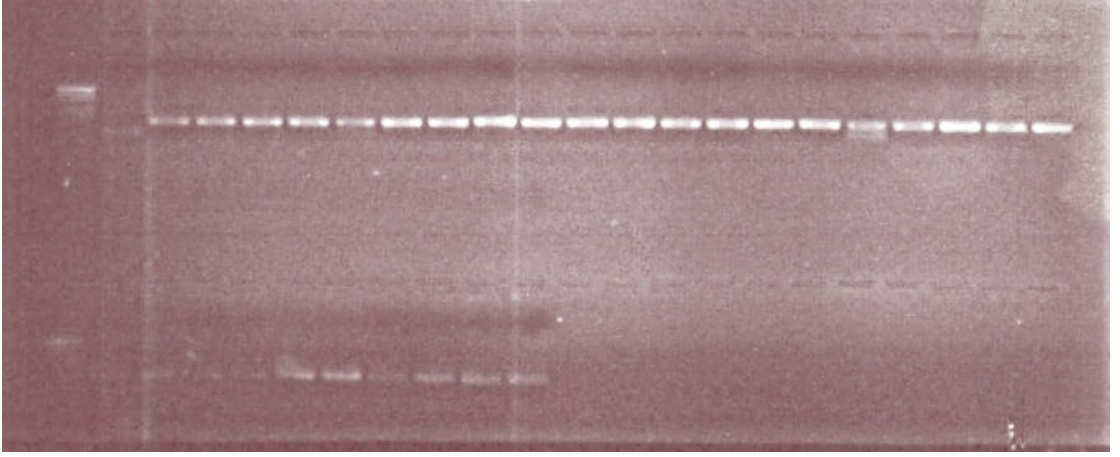
Şekil 11. TLR-4 299 primerleriyle tanımlanan bölge PZR ile çoğaltılmış ve burada görüldüğü gibi diğer hastalardada farklı bir bant bulunmamıştır.



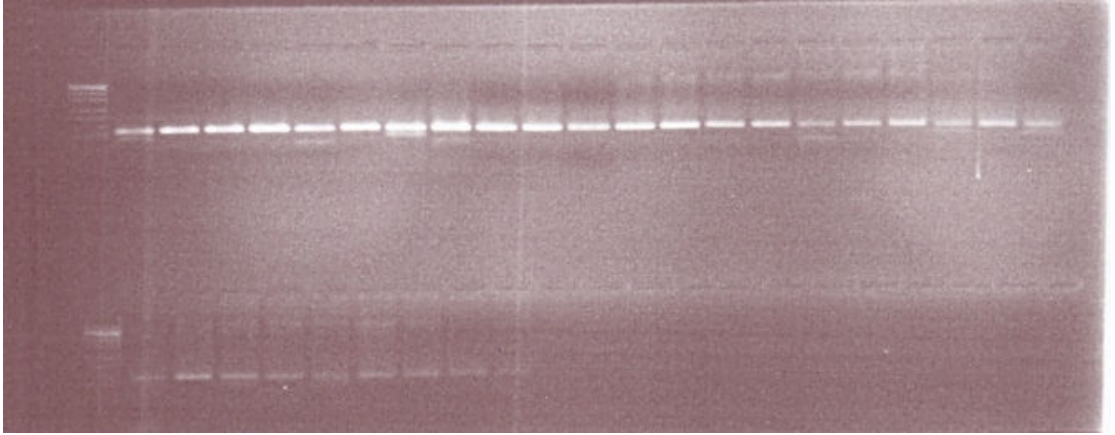
Şekil 12. Bir kısım hastalara ait örnek gösterilen şekilde TLR-4 299 primerleriyle tanımlanıp PZR ile çoğaltılan bölgeler Nco I RE kesim enzimiyle muamele edilip yapılan tarama da farklı bantlar bulunmaması bu bölgede Behçet hastaları arasında bir mutasyon olmadığını göstermektedir.



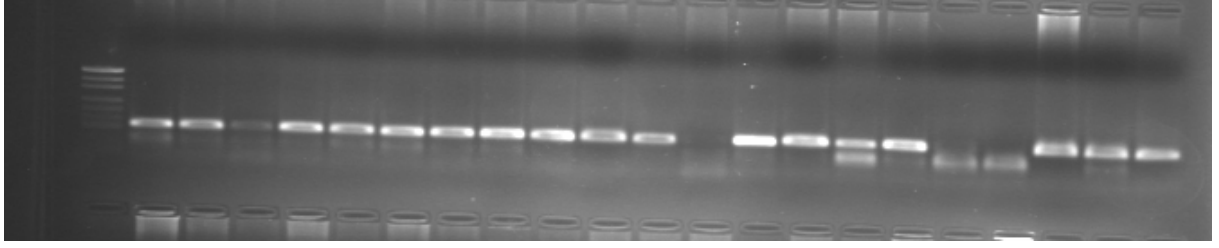
Şekil 13. TLR4 399 primer çiftinin PZR reaksiyonunun uygun çalışma koşullarını ortaya koymak için yapılan çalışmada uygun erime ısısının 59.3°C olduğu bulunmuştur.



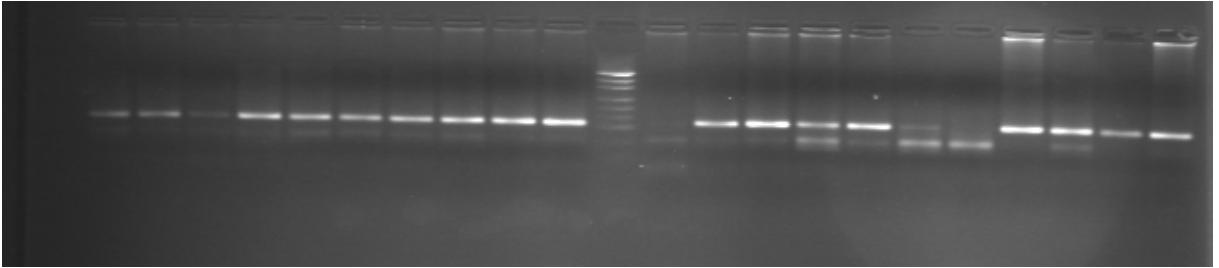
Şekil 14. TLR-4 399 primer çiftinin 124 bç büyüklüğündeki PZR ürün allellerinin kontrol grubunda dağılımı %1 lik agaroz jelde görülmektedir. Kontrol grubunda bir uzun ve birde kısa allellerin olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 16. bantda hem kısa hem uzun alleli taşıyan heterozigot yapı görülmüştür.



Şekil 15. TLR-4 399 primer çiftinin 124 bç lik PZR ürünleri Hinf I ile kesildikten sonra %3 lük agaroz jelde görüntüleri incelendiğinde burada da kısa ve uzun alleller gözlemlenmiştir. 5,8,16,19,21 bantları kısa ve uzun alleller için heterozigot, 7 bant da bir ara allel gözlemlenmiştir.



Şekil 16. Hasta grubunda TLR-4 399 primer çiftinin 124 bç lik PZR ürünlerinin %1 lik agaroz jel elektroforezinden sonraki dağılımı görülmektedir. Bir kısım hasta grubu örnek olarak gösterilmekde ve burada da hem uzun hem kısa alleller görülmektedir.



Şekil 17. Hasta grubunda TLR-4 399 primer çiftinin 124 bç lik PZR ürünlerinin Hinf I RE enzimiyle kesildikten sonra %3 lük agaroz jel elektroforezinden sonraki dağılımı görülmektedir. Yukarıdaki şekildeki aynı hasta grubun da RE enziminin sonra aynı bantların çıkması hasta gruplarında da hem uzun hem de kısa allelerin varlığı tesbit edilmiştir. Bunlardan 17. bant homozigot kısa allel 14, 16 ve 19. kuyularındaki bantlar heterozigot allel özelliği göstermektedir.

4.1 Grupların mutasyon ve gen çokyapılılığı dağılımları.

TLR-2 de bir bölge ve TLR-4 de iki bölge taranmış ve herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir (şekiller 9,12,15 ve 17). Allel dağılımları hem hasta hem de kontrol grubunda TLR-4 399 da primer çifti PZR ürünlerinde gözlenmiştir (şekiller 14,15,16 ve 17) . Tablo 12 de görülen allel dağılımı kontrol grubu sayısının azlığından dolayı kısa allel yüzdesinin yüksekliği tamamen tesadüfidir.

Tablo11. Gen çokyapılılık dağılımı. TLR-4 399 primer çiftinde görülen kısa ve uzun allel dağılımı.

<i>allel</i>	<i>KONTROL n:30</i>	<i>HASTA n:75</i>
kısa	1	1
uzun	1	3
alleli görülme sıklığı	1/30	3/75

4.2 Sonuçların İstatistikî Yöntemlerle Analizi

İncelenen bölgelerin hiçbirinde mutasyon çıkmadığı için istatistiksel yöntemlere başvurulmamıştır.

5.TARTIŞMA

Toll like reseptör ailesi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin işlevsel hale gelip ilk bağışıklık cevabın oluşmasında önemli bir rol oynar (58,59). Bugüne kadar toll like reseptör ailesinin değişik alt grupları karakterize edilmiştir (60). TLR-2 peptidoglycan ve lipoproteinlerle aktive edilirken TLR-4 ise liposakkaritler ve lipoteykoik asitlerle uyarılmaktadır (60).

TLR-2 ve TLR-4, Nf-κB ve IL-1 gibi iltihap tetikleyici sitokinleri tetiklemekte böylelikle innate immün sistemde kilit rol oynadığı gibi sonradan kazanılmış bağışıklık cevabı da etkilemektedir (61). Birçok çalışmada TLR lerin bağışıklık sistemindeki düzensizliklerle ilişkili olduğuna dair ipuçları bulunmuştur (62). TLR-4 deki mutasyonlar lipopolisakkaritlere karşı olan inflamatuvar cevabı etkiler ve gram negatif infeksiyon ve septik şok riskinde değiştirir (63,64,65). Başka bir çalışmada TLR-4 Asp299Gly mutasyonu ile Chron hastalığı ve ülseratif kolitis arasında yeni bir ilişki bulunmuştur (66).

Şimdiye kadar TLR-2 de iki (Arg677Trp ve) TLR-4 de iki tane(Asp 299Gly ve Thr399Ile) mutasyonları tanımlanmıştır (67).

Behçet hastalığının patogenezinde gram pozitif bir bakteri olan streptococcus mitisin rolünün olduğu düşünülürse streptokok bakterilerin peptidoglycan ve lipoproteinlerine veya liposakkaritler ve lipoteykoik asitlerine karşı bağışıklık cevabın oluşmasında rolü olan TLR-2 ve TLR-4 ün yapısındaki bu mutasyonlarla Behçet hastalığı arasında bir ilişki olduğu araştırılmıştır. Mutasyonları içeren gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu sonucu çoğaltılması ve MspI (Arg677Trp) HinfI (Thr399Ile) ve NcoI (Asp 299Gly) kesim enzimleri ile kesilmesi sonucunda çalışılan bölgelerin hiçbirinde mutasyona rastlanmazken Thr399Ile bölgesini içeren DNA parçasında kontrol grubunda bir kısa bir uzun allele rastlanırken hasta grubunda ise 1 kısa 3 uzun allele rastlanmıştır. Thr399Ile bölgesinde bulunan bu yeni yayınlanmamış haplotiplerin toplumda sıklığının belirlenmesi için ileride yapılacak çalışmalarda dikkate alınması gerekir. Çalışılan hasta grubunda hernekadar mutasyona rastlanmamışsa da TLR lerin Behçet hastalığındaki rolleri daha iyi anlayabilmek için bunların uyarı iletim yollarlarının incelenmesi de gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. OHNO S, M. OHGUCHI, S. HIROSE, H. MATSUDA, A. WAKISAKA and M. AIZAWA (1982) Close association of HLA-Bw51 with Behcet's Disease Arch. Ophthalmol.100:1455-1458
2. LEHNER T.,LAVERY E.,SMITH R., ZEE V. D.,MIZUSHIMA Y., SHINNICK T (1991) Association between the 65-Kilodalton Heat Shock Protein , Streptococcus sanguis, and the Corresponding Antibodies in Behcet's Syndrome. Infection and Immunity ,April. 1991 p.1434-1441
3. KORAUCHI T, YOKOTA K, MATSUA T, FUJINAMI Y, ISOGAI E, ISOGAI H, OHTSUKI H, OGUMA K. Neutrophil and lymphocyte responses to oral Streptococcus in Adamantiades-Behcet's disease (2005) FEMS Immunology and Medical Microbiology 43 (2005) 125-131
4. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity (2005) International Immunology Vol. 17, No. 1 ,pp. 1-14.
5. OHNO S.(1986) Behçet disease in the world.In recent advances in Behçet Disease,pp.181-186,Lehner T.and Barnes c.g.(eds), Royal society of medicine services, London.
6. MOUTSOPOULUS H.M (1991)Behçet's syndrome. In Principles of Internal Medicine, pp.1455-1456,Wilson D,Baunwald E., Isselbacher J.,Petersdorf G.,Martin B.,Fauci A.and Root R.(eds),McGraw-Hill,New York.
7. KAKLAMANI V.G.,VAIOPOULAS G.and KAKTAMANI P.(1998)Behcet's disease.Seminars in Arthritis and Rheumatism 27:197-217
8. M.ZIERHUTN. MIZUKIB.C. Ohnod, H. Inokoc,A.GUL, K. Onoéf and E. Isogai (2003) Immunology and functional genomics of Behçet's disease 60 (2003) 1903 Cellular and Molecular Life Sciences –1922
9. Barnes CG, Yazici H: Behcet's syndrome. Rheumatology (Oxford) 38:1171–4, 1999

- 10.** Gbate JV, Jorizzo JL: Behçet's disease and complex aphthosis. *J Am Acad Dermatol* 40:1–18, 1999
- 11.** Gurler A, Boyvat A, Tursen U: Clinical manifestations of Behçet's disease: an analysis of 2147 patients. *Yonsei Med J* 38:423–7, 1997
- 12.** EVEREKLIOĞLU C.(2005) Current concepts in Etiology and Treatment of Behçet Disease *Survey of Ophthalmology* V: 50 Issue 4 page 297-350
- 13.** www.hulusibehcet.net
- 14.** www.dermnetnz.org/vascular/erythema-nodosum.html
- 15.** TUGAL-TUTKUN I, URGANCIOĞLU M: Childhood onset uveitis in Behçet Disease:a descriptive study of 36 cases. *Am J of Ophthalmology* Volume 136, Issue 6, Pages 1114-1119
- 16.** ÖZEN S: (1999). Vasculopathy,Behçets Syndrome,and familial Mediterranean fever.*Curr Opin Rheumatology* 11.393-8,1999.
- 17.** International Study Group for Behçet's Disease (1990): Criteria for diagnosis of Behçet's disease: *Lancet* 335:1078–80.
- 18.** AKTULGA E, et al.:(1980). A double blind study of colchicine in Behçet's disease. *Haematologica* 1980, 65(3):399-402.
- 19.** YURDAKUL S, et al.: (1998). A double blind study of colchicine in Behçet's syndrome (BS). *Arthritis Rheum* 41(suppl):S356.
- 20.** BANG D: (1997). Treatment of Behçet's disease. *Yonsei Med J* 38(6):401-410.
- 21.** BEN EZRA D, et al.: (1988). Evaluation of conventional therapy versus cyclosporin A in Behçet's syndrome. *Transplant Proc* 20 (3 suppl 4):136-143.
- 22.** O'DUFFY JD, et al.: (1998). Interferon alfa treatment of Behçet's disease. *J Rheumatol* 25:1938-1944.
- 23.** ZOUBOULIS CC: (1998). Treatment of Adamantiades-Behçet disease with systemic interferon alfa. *Arch Dermatol* 134:1010-1016.

24. KOTTER I: Treatment of ocular symptoms of Behçet's disease with interferon alfa-2a: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 1998, 82(5):488-494
25. HAMURYUDAN V, et al.: Thalidomide in the treatment of the mucocutaneous lesions of the Behçet syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998, 128(6):443-450.
26. MIZUKI N.and OHNO S.(1998) Molecular genetics (HLA) of Behçets Disease. *Yonsei Med.J.* 38:333-349
27. M.ZIERHUTN. MIZUKIB.C. Ohnod, H. Inokoc,A.GUL, K. Onoéf and E. Isogai (2003) Immunology and functional genomics of Behçet's disease 60 (2003) 1903 *Cellular and Molecular Life Sciences* –1922
28. www-ermm.cbcu.cam.ac.uk(Expert Reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University Pres)
29. AOKI K, CHOO S(1972) Studies on the constraction and past history of patients with Behcet's disease. *Acta Soc.Ophthalmol.* 76, 1608-1612
30. MARTIN DK, Nelms, D.C, Manckler, B.F. and Behçet's syndrome.Clin. Immunol.Immunopathol13,146-155.
31. KAWAGOE M,KONTANI S, TAKEDA H.Immunopathological activities of extracellular products of *Streptococcus mitis*,particularly a superantigen fraction.*Infect Immun* 1995:63:785-793
32. MATSUSHITA K, FUJIMAKI W, KATO H,UCHIYAMA T,IGARASHI H, OHKUNI H,et al.Immunopathological activities of extracellular products of *Streptococcus mitis*,particularly a superantigen fraction.*Infection immun* 1995:63:785-793
33. MATSUSHITA K, SUGIYAMA A, UCHIYAMA T , IGARASHI H ,OHKNI H,NAGAOKA S,et al.Induction of lymphocytes cytotoxic to oral epithelial cells by *Streptococcus mitis* superantigen.*J Dent Res* 1996:75:927-934

34. AOKI K.and CHOO S.(1972) Studies on the construction and past history of patients with behçet's disease .Acta soc.opthalmol.76, 1608-1612

35. The Behçet's Disease Committee of Japan (1989)Skin hypersensivity to streptococcus antigens and the induction of symptoms by the antigens in behçet's disease .J Rheumatol. 16,506-511.Trents with Behçet s disease(BD) in Japan.Clin exp immunol 1997;108:204-12.

36. ÇALGÜNERİ M,KİRAZ S, ERTENLİ İ, BENEKLİ M, KARAASLAN Y, ÇELİK İ. (1996) The effect of prophylactic penicilin treatment on the course of arthritis episodes in patients with behcets disease. A randomized clinical trial. Arthritis Rheum 1996;39:2062-5

- 37.MOCHIZUKİ N, SUZUKI N, TAKENO M, NAGAFUCHI H, HARADA T, KANEOKA H,ET AL. Fine antijen specifity of human gama delta T cell lines (v gama 9+) established by repetetive stimulation with a serotype (KHT -1) Of a gram pozitive bacterium, Streptocossus sanguis (1994). Eur J Immunol 1994;24:1536-43

38. LEHNER T. The role of heat shock protein ,microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behcet's disease.Int rev Immunol 1997;14:1071-1072

39. Lehner T. (2000) Immunopathogenesis of Behçet's disease. In:Behçet's Disease, pp. 3-18, Bang D., Lee E.-S. and Lee S.(eds), Design Mecca, Seoul

40. WANG XL,WANG J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Mol genet Metab 70:241-251

41. FARRELL AJ, BLAKE DR: Nitric oxide. Ann Rheum Dis 55:7-20, 1996

42. EVEREKLİOĞLU C, INALÖZ HS, KIRTAK N, et al: Serum leptin concentration is increased in patients with Behçet's syndrome and is correlated with disease activity. Br J Dermatol 147:331-6, 2002

43. GUNDUZ K, OZTURK G, SOZMEN EY, et al: Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and plasma nitrite and nitrate levels in patients with Behçet disease and recurrent aphthous stomatitis. Clin Exp Dermatol 29:176-9, 2004

44. OREM A, VANIZOR B, CIMS,IT G, et al: Decreased nitric oxide production in patients with Behcet's disease. *Dermatology* 198:33–6, 1999
45. SENTURK MU, SENTURK UK, BASAK PY, et al: Serum and skin nitrite levels in patients with Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17:614–5, 2003
46. KARASNEH JA, HAJEER AH, SILMAN A, et al: Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease. *Rheumatology* 44:614–7, 2005
47. KIM JU, CHANG HK, LEE SS, et al: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 62:1083–7, 2003
48. SAVARANI C, BOIARDI L, CASALI B, et al: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease. *J Rheumatol* 29:535–40, 2002
49. WEIGL E,KOPECEK P,RASCA M,HRADILIVA S.(1999) Heat shock proteins in immune reactions. *Folia Microbiologica* 44,561-6
50. KANEKO S, SUZUKI N,YAMAHITA N et al.Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behçet's disease(BD) in Japan.*Clin Exp Immunol* 1997;108:204-12
51. DIRESKENELI H, EKSIOGLU-DEMIRALP E, YAVUZ S et al.T cell responses to 60/65 kDa heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's Disease .*J Rheumatol* 2000;27:708-13
52. ERGUN T. , İNCE U.,EKSIOGLU-DEMIRALP E et al.HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behçet's disease.*J Am Acad dermatol* 2001;45:904-9
53. TAKEDA, K., KAISHO, T. and AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors *Annu. Rev. Immunol.* 21:335
54. NETEA, M. G., VAN DEUREN, M., KULLBERG, B. J., CAVAILLON, J. M and VAN DER MEER W.M 2002 Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll like receptors? *Trends Immunol.*23:135

55. www.innateimmunity.net
56. İĞCİ, YZ. Gebelikte serum arginaz seviyesi ile arginaz gen çokyapılılığı arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans
57. SAMBROOK, J., RUSSEL, DW.: Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol.2, 2001
58. IMLER JL,HOFFMANN JA.Toll receptors in innate immunity.Trends Cell Biol 2001;11:304-11.
59. TAKEDA K,KAISHO T., AKIRA S. Toll-like receptors:Annu Rev Immunol 2003 21:335- 76.
60. TAKEUCHI O, HOSHINO K,KAWAI Tet al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity 1999;11:443-51
61. SHIZUO A,TAKEDA K,KAISHO Toll like receptors:critical proteins linking innate and acquired immunity.Nat Immunol 2001;2:675-80
62. ARBOUR N, LORENZ E, SCHUTTE B et al.TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.Nat Genet 2000;25:187-91
63. SHWARRZT DA.(2002) Tlr4 and LPS hyporsponsiveness in humans Int J.Hyg Environ Health 205:221-227 ,2002
64. SCHMITT C. HUMENY A, BECKER CM, BRUNE K, PAHL A:(2002) Polymorphism of tlr4 :rapid genotyping and reduced response to lipopolysccharide of tlr4 mutant alleles.Clin Chem 48:1661-1667.
65. ARBOUR NC, LORENZ E, SCHUTTE BC, ZABNER J, KLINE NJ, JONES M, FREES K, WATT JL, SCHWARZT DA: (2000) TLR4 Mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans Nat Genet 25:187-191.
66. FRANCHIMONT D, VERMEIRE S, EL HOUSNI H, PIERIK M, VAN STEEN K, GUSTOT E, QUERTINMONT E, ABRAMOWICZ M, VAN GOSSUM A, DEVIERE J,

RUTGEERTS P (2004) Deficient host bacteria interactions in inflammatory bowel disease ? The toll-like receptor TLR-4 Asp299gly polymorphism is associated with Chron's disease and Ulcerative Colitis GUT 2004;987-992.

67. ARBOUR N, LORENZ E, SCHUTTE B et al. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 25:187-91.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Uzunpınar, Kayseride doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kayseride bitirdikten sonra girdiği Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fizik Öğretmenliği bölümünü 2005 de tamamlayarak aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde bulunan Tıbbi Biyoloji yüksek lisans programına giriş sınavını kazanarak bu bölümde yüksek lisans eğitimine başladı.İngilizce bilmektedir ve bekardır.