

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PINK1 VE SWAP70 GENLERİNİN KLONLANMASI İLE
OLUŞTURULAN PROTEİNLERİN BEHÇET
HASTALARINDA ELISA YÖNTEMİ İLE TARANMASI**

ELİF UĞUREL

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR ÖZBEK**

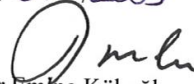
GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

21 / 07 / 2009

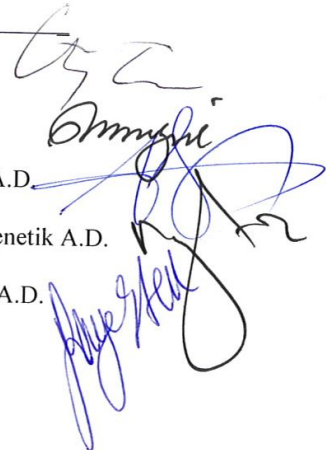

 Prof. Dr. Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Genetik
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : DETAE Genetik A.D.
 Tez Sahibi : Elif Uğurel
 Tez Başlığı : PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanmasıyla Oluşturulan Proteinlerin Behçet Hastalarında ELISA Yöntemi ile Taranması
 Sınav Yeri : DETAE Toplantı Salonu
 Sınav Tarihi : 8 / 07 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Uğur Özbek, İstanbul Üniversitesi, DETAE Genetik A.D.
2. Prof. Dr. Ahmet Gül, İstanbul Üniversitesi, İç Hastalıkları A.D.
3. Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu, İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji A.D.
4. Yard. Doç Dr. Ali Güre, Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.D.
5. Yard. Doç. Dr. Gaye Erten, İstanbul Üniversitesi, DETAE İmmunoloji A.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Elif Uğurel



ÍTHAF

Ailem'é

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında Prof. Dr. Uğur Özbek'e ve Dr. Burçak Vural'a bana büyük emekleri geçtiği için,

Genetik Ana Bilim Dalı Lab I'deki tüm hocalarıma ve öğrenci arkadaşlarıma her türlü destekleri ve yardımları için,

ve aileme en başından beri esirgemedikleri maddi ve manevi destekleri ve sonsuz sabırları için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:3351

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİ
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Behçet Hastalığı	4
2.1.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Behçet Hastalığının Genetik Yatkınlığı	4
2.1.3. Behçet Hastalığında Mikrobiyal Ajanların Rolü	6
2.1.4. Behçet Hastalığında İmmunolojik Anormallikler ve Antijen Kaynaklı İmmunYanıt.....	7
2.1.5. Behçet Hastalığının Otoinflamatuvar ve Otoimmün Hastalıklardaki Yeri.....	8
2.2. PINK1 Geni ve Fonksiyonları.....	10
2.3. SWAP70 Geni ve Fonksiyonları.....	16
2.4. PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanması ve Protein Ekspresyonu.....	21
2.5. ELISA.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Gereç.....	25
3.1.1. Hasta ve Kontrol Örnekleri.....	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.3. Kimyasallar	26
3.1.4. PZR, Enzim Kesimi Malzemeleri ve Kitler.....	27

3.1.5. Gerekli Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması.....	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. SWAP70 ve PINK1 Genlerinin PZR Yöntemi ile Amplifikasyonu....	28
3.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
3.2.3. PZR Ürününün Jelden Purifikasyonu.....	30
3.2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Yapışkan Uçların Oluşturulması.....	31
3.2.5. Plazmid Enzim Kesiminin Defosforilasyonu.....	32
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
3.2.7. Enzim Kesim Ürünlerinin Jelden Purifikasyonu.....	33
3.2.8. Ligasyon.....	33
3.2.9. Kompetan Hücrenin Hazırlanması.....	34
3.2.10. Transformasyon.....	35
3.2.11. Plazmid İzolasyonu.....	35
3.2.12. Protein Purifikasyonu.....	37
3.2.13. Bradford Metodu Kullanılarak Protein Konsantrasyon Tayini.....	38
3.2.14. Gümüş Boyama Yöntemleri ile SDS-PAGE.....	39
3.2.15. ELISA.....	41
3.2.16. İstatistik Yöntemler.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanması.....	43
4.2. PINK1 ve SWAP70 Ekspresyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	45
4.3. ELISA.....	46
5. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	56
FORMLAR.....	64
ETİK KURUL KARARI.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	69

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Bradford standart dilüsyon hazırlanması.....	39
Tablo 4.1: t-test sonucuna göre hastalar ve kontrollerdeki ortalama değerler.....	48
Tablo 4.2: Hasta ve normal gruplarındaki seropozitif ve seronegatiflik.....	49
Tablo 4.3: SWAP70'e karşı oluşan antikor yanıtının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımı	50
Tablo 4.4: SWAP70 antikor yanıtının Behçet Hastalığı alt gruplarında tutulumu olan ve olmayan hastalar arasındaki dağılımı.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Behçet hastalığının otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların sınıflandırılmasındaki yeri gösterilmektedir	9
Şekil 2.2: PINK1'in mitokondri ve sitozolde etkileştiği proteinlerin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.3 : Mast hücre FcεRI sinyalizasyonunda SWAP70 fonksiyonunun şematik gösterimi.	20
Şekil 2.4.: Klonlama basamakları	21
Şekil 2.5: Rekombinant pQE-30 ile pREP4 plazmidin IPTG ile uyarılmasını gösteren şema	22
Şekil 2.6: 6xHis tag proteinlerin doğal ve denatüre edici koşullardaki purifikasyon basamakları.....	23
Şekil 2.7: ELISA yönteminin basamaklarını gösteren şematik resim.....	24
Şekil 3.1: PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Soldaki resim SWAP70'e ait agaroz jel görüntüsüdür.....	30
Şekil 3.2: Restriksiyon enzim kesmlerine ait agaroz jel elektroforezi	32
Şekil 4.1: SWAP70 kodlayan gen dizisi.....	43
Şekil 4.2: PINK1 kodlayan gen dizisi.....	44
Şekil 4.3: SWAP70' e ait ve PINK1'e ait transformasyon sonrasında üremenin gözleendiği petripler.....	44
Grafik 4.1: Bradford standart grafiği.....	45
Şekil 4.4: SDS-PAGE görüntüsü.....	46
Grafik 4.2: SWAP70 antijeni için sağlıklı kontrollerdeki ELISA değerlerinin dağılımları.....	47
Grafik 4.3: SWAP70 antijeni için hastalardaki ELISA değerlerinin dağılımları.....	48
Grafik 4.4: SWAP70 antijeni için hastalarda ve normallerdeki ELISA değerleri.....	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HLA-B	Human leukocyte antigen B
MHC	Major histocompatibility complex
kD	Kilodalton
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
LB agar	Luria Bertani agar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TAE	Tris asetik asit EDTA
dk	dakika
OD	Optik dansite
SDS	Sodyum dodesil sülfat
IPTG	İzopropil β -D-1 tiogalaktopiranozid
PBS	Fosfat salin buffer
SD	Standart sapma

ÖZET

Uğurel, E. PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanmasıyla Oluşturulan Proteinlerin Behçet Hastalarında ELISA Yöntemi ile Taranması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Behçet hastalığı genel olarak tekrarlayan oral aftlar, genital ülserasyonlar, deri lezyonları ve üveit ile karakterize olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığının etiopatogenezi bilinmemektedir. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Behçet hastalığının patogenezinin belirlenmesine yönelik SEREX yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda PINK1 ve SWAP70 antijenlerine karşı otoantikor yanıtının olduğu gözlenmiştir. PINK1 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının sadece Behçet hastalarında görülmesi PINK1'in Behçet hastalığında yeni bir aday belirteç olabileceğini ortaya koymaktadır. SWAP70 antikor varlığının Behçet hasta alt gruplarından vasküler tutulum ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Behçet patogenezi açısından anlamlı olabileceği düşünülen PINK1 ve SWAP70 antijenlerinin, daha fazla örnekte ve daha hızlı taranabilmesi için, proteinlerin sentezlenerek ELISA yöntemi ile taranması da çalışmamızın bir sonraki aşaması olarak düşünülmüştür.

Bu tez projesinde PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanarak ekspresyonlarının gerçekleştirilmesi ve elde edilen proteinlere/antijenlere karşı oluşacak otoantikor yanıtının Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. SEREX yöntemi ile PINK1 pozitif olduğu belirlenmiş bir grup Behçet hasta ve normal serum örneğinde, PINK1 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının değerlendirilmesi için ELISA yöntemi ile denendiğinde düşük değerler gözlenmiştir. SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtı değerlendirildiğinde ise Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerindeki ELISA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0,9293$). Seropozitifliği belirlemek için $+2SD$ değeri kesim noktası olarak alındığında 7 hasta seropozitif olarak belirlenmiş ve normaller ile karşılaştırıldığında anlamlılık bulunmuştur ($p= 0,014$). Seropozitif ve seronegatif hastalardaki SWAP70 antikorlarının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımına bakıldığında da anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler : Behçet hastalığı, PINK1, SWAP70, ELISA, antikor yanıtı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3351

ABSTRACT

Uğurel, E. (2009). Screening of Patients with Behçet's Disease by ELISA Method with Proteins Constituted by Cloning of PINK1 and SWAP70 Genes. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme. İstanbul 2009.

Behçet's disease is a chronic inflammatory disorder characterized by recurrent uveitis, skin lesions, oral aphthous and genital ulcers. The etiopathology of BD remains unclear. In individuals who are genetically susceptible, immunological abnormalities which are triggered by microbial pathogens are thought to have an important part in pathogenesis of Behçet's disease.

According to the results of studies by SEREX for research of pathogenesis in Behçet's disease, autoantibody response to PINK1 and SWAP70 was found. It is thought that PINK1 may be a new candidate marker for BD since antibody response to PINK1 antigen has been identified only in BD patients. It is found that presence of SWAP70 antibodies were associated with vascular involvement among BD clinical sub-groups. It is thought that the next step of our study would be screening with ELISA in order to screen fast in an abundant of samples after synthesizing the proteins of PINK1 and SWAP70 which are considered as significant in BD pathogenesis.

In this thesis project it is aimed to have expressions of PINK1 and SWAP70 by cloning and identify antibody responses to these proteins/antigens by ELISA method in the sera of Behçet's disease patients and healthy controls. In order to evaluate antibody response to PINK1 antigen expressed in this study, low values were obtained by ELISA method in the sera of Behçet's disease patients that known as PINK1 positive by experiments with SEREX. In order to evaluate antibody response to SWAP70 antigen, it is not found any statistically significance between ELISA values of samples in the groups of Behçet's disease and healthy controls ($p= 0,9293$). When the threshold was calculated as $+2SD$ to determine seropositivity, 7 patients were found as seropositive and there was found a significance when comparing to controls ($p= 0,014$). SWAP70 antibodies in seropositive and seronegative patients were compared to BD subgroups but no significant difference was found.

Key words: Behçet's disease, PINK1, SWAP70, ELISA, antibody response

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.3351.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Behçet hastalığı heterojen özellikte, tekrarlayan ataklar ile karakterize, patogenezi ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bir multisistem inflamatuvar hastalıktır. Tekrarlayan oral ve genital ülserler ve panüveit ile karakterizedir. Hastalığın klasik triadı 1937’ de Hulusi Behçet tarafından tanımlanan tekrarlayan oral ve genital ülserler ile hipopyonlu iritistir (61).

Behçet Hastalığı bilinmeyen etiyolojisi ile kronik inflamatuvar bir bozukluktur. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, hastalığın patogenezinde önemli olduğu uzun zamandır öne sürülmektedir. Behçet hastalığında monosit ve lenfositlerin çeşitli sitokinleri artmış oranda eksprese ettiği bildirilmiştir. Genellikle Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış sekresyonu, hastalığın özellikle aktif döneminde belirgindir. Ayrıca hastalığın kliniksel aktivitesi ile birlikte seyreden oligoklonal T hücre genişlemesi, Behçet hastalığı immunopatogenezinde antijen kaynaklı immun yanıtı gösterir (29).

Behçet hastalığında bazı otoantijen ve inflamatuvar cevabın varlığı gösterilmiştir. Örneğin, anti-endothelial hücre antikor, non-spesifik bulgu olmasına rağmen hastalarda sık rastlanmaktadır. Retinal S antijen, retinada ifade edilen ve hastalarda üveit ile ilişkili antikorların geliştirebildiği bir otoantijendir. Diğer olası aday otoantijenler içinde, ısı şoku proteinleri (hsp), tropomiyosin ve okside düşük yoğunluklu lipoprotein yer almaktadır. Behçet Hastalığının patogenezinin aydınlatılmasına ilişkin moleküler biyolojik ve genetik çalışmalar tüm dünyada ve ülkemizde devam etmektedir. Bugüne kadar farklı toplumlardaki Behçet hastalarında, protein düzeyinde yapılan çalışmalar sonucunda farklı otoantijenler belirlenmiştir. Kinectin, Sip-1 ve SBP en son yayınlanan ve Behçet Hastalığında yeni otoantijen adayı olarak sunulan proteinlerdendir. Behçet hastalarında farklı bölgeler tutulum göstermektedir. Tutulum bölgesine göre farklı otoantijenlerin bulunabileceğini göz önünde tutmak gerekmektedir. Ayrıca hastalığın çıkışında genetik yatkınlık ve çevrenin etkisini de unutmamak gerekmektedir. Bununla birlikte, bu antijenlerin gerçekten patojenik olup olmadıkları veya onlara karşı direkt immün cevabın hastalık aktivasyonu ile bağlantılı non spesifik inflamatuvar reaksiyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala bilinmemektedir.

Behçet hastalığının patogenezinin belirlenmesine yönelik SEREX (Serological analysis of cDNA expression libraries) (cDNA ekspresyon kütüphanelerinin serolojik analizi) yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda PINK1 ve SWAP70 antijenlerine karşı otoantikör yanıtının olduğu gözlenmiştir. PINK1 antijenine karşı oluşan antikör yanıtının sadece Behçet hastalarında görülmesi PINK1’in Behçet hastalığında yeni bir aday belirteç olabileceğini

ortaya koymaktadır. SWAP70 antikor varlığının Behçet hasta alt gruplarından vasküler tutulum ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), ökaryotlardaki intraselüler sinyallerin artırılması ve iletilmesinde rol alan enzimlerden protein kinaz ailesinin bir üyesidir. PINK1, nöronal yaşamsallığı sağlayan ve anahtar rolü oynayan hücresel proteinlere bağlanarak veya direkt olarak fosforilleyerek görev alabilir (50). N-terminalinde mitokondriyal hedef motifi ve Ca/kalmodulin ailesinden serin/treonin kinazlara homoloji gösteren yüksek oranda korunmuş bir kinaz domain bulunduran PINK1 geni, 581 amino asitlik bir protein kodlar (24,43). PINK1 mRNA'sı en çok kalp, kas ve testislerde olmak üzere birçok insan dokusunda eksprese edilir, bu yüzden hücrede yararlı rollerinin olduğu düşünülmektedir (94).

PINK1 gen lokusundaki homozigot ve heterozigot mutasyonlar, PARK6 ailesel Parkinsonizm'e sebep olduğu bildirilmiştir. Otozomal resesif olan ve erken ortaya çıkan Parkinson hastalığındaki PINK1 mutasyonlarının prevalansı %0-15'tir (94). Dopaminerjik hücre soylarında PINK1 için siRNA kullanılarak yapılan çalışmalar, mitokondriyal fonksiyonun ileri derecede kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu durum ATP sentezinin azalmasına, oksidatif strese karşı hassasiyete ve apoptoza yol açar (25). Vahşi tip (Wild-type) PINK1'in, apoptoza ve proteozomal inhibisyona karşı hücreleri koruduğu ve böylece PINK1 proteininin nöroprotektif bir rolünün olabileceği, yapılan fonksiyonel çalışmalarda gösterilmiştir (24).

SWAP70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm (switch) bölgesi substratları arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (7). DNA'ya karşı zayıf bir afinitesi olan, ATP bağlayan ve SWAP kompleksindeki diğer proteinler ile yüksek afiniteli kompleksler oluşturan SWAP70, nükleer bir protein olarak tanımlanmaktadır (8). SWAP70 N-terminalinde kalsiyum iyonu bağlayan EF-hand motifi, merkezinde plekstrin homoloji (PH) domaini, üç tane nükleer lokalizasyon sinyali, nükleer eksport sinyali, Dbl homoloji domaini ve C-terminalinde 'coiled-coil' bölgesi bulunmaktadır (27,89). Timus ve kemik iliğinde zayıf bir şekilde eksprese olan SWAP70'in, dönüşüm (switch) için uyarılmış dalak hücrelerinde SWAP70 RNA'sının belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir.

SWAP70 proteini üç tane nükleer lokalizasyon sinyali içermektedir ve hem nukleusta hem de sitoplazmada varlığı gösterilmiştir. Fakat nükleer yapılara ya da kromatine karşı zayıf bir afinitesi bulunmaktadır (7). SWAP70, aderent hücrelerde sitoplazmaya lokalize olduğu ve büyüme faktörü uyarının ardından membran dalgalarına transloke olduğu gösterilmiştir. Bu olay SWAP70'in PH domaini ile PtdIns(3,4,5)P3 etkileşimi ile gerçekleşir ve aktin filamentleri ile

birlikte lokalize olur (27). Ayrıca SWAP70'in mast hücre degranülasyonu için gerekli olduğu ve ilgili olan sinyal yolağında yer aldığı düşünülmüştür (89).

Behçet patogenezi açısından anlamlı olabileceği düşünülen PINK1 ve SWAP70 antijenlerinin, daha fazla örnekte ve daha hızlı taranabilmesi için, proteinlerin sentezlenerek ELISA yöntemi ile taranması da çalışmamızın bir sonraki aşaması olduğu düşünülmüştür.

Bu tez projesinde PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanarak ekspresyonlarının gerçekleştirilmesi ve elde edilen proteinlere/antijenlere karşı oluşacak otoantikör yanıtının Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Behçet Hastalığı

2.1.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi:

Behçet hastalığı (BH) heterojen, tekrarlayan, patogenezi ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bir multisistem inflamatuvar hastalıktır. Tekrarlayan oral ve genital ülserler ve panüveit ile karakterizedir. Hastalığın klasik triadı 1937 de Hulusi Behçet tarafından tanımlanan tekrarlayan oral ve genital ülserler ile hipopyonlu iritistir (61). Behçet hastalığı oral aftoz ülserler, oküler lezyonlar, deri lezyonları ve genital ülserasyonlar olmak üzere dört ana semptom ile karakterize, tekrarlayan sistemik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Sık olarak eklemler, böbrekler, akciğerler, gastrointestinal yol, santral sinir sistemi ve vasküler sistemin dahil olduğu bütün vücuttaki organ ve dokularda meydana gelen inflamasyon ile karakterizedir (19,98).

Behçet hastalığı için Uluslararası Çalışma Grubu'nun belirlediği kriterler şunlardır: Ağızda tekrarlayan majör ya da minör aftlar veya ülserasyonlara ek olarak; tekrarlayan genital ülserasyon, eritema nodosum, psödofolikülitis, papulopüstüler yapılar, akneiform nodüller, pozitif paterji testi, anterior ya da posterior üveit ve retinal vaskülit (37).

Behçet hastalığı belirli bir epidemiyolojik özellik gösterir. Akdeniz havzasından Japonya'ya kadar uzanan coğrafik alanda daha sık görülür. Bu bölge eski İpek Yolu'na denk gelir ve sağlıklı popülasyonda HLA-B51' in yüksek sıklığı ile beraber seyretmektedir. Behçet hastalığına olan genetik yatkınlığın, bu yol üzerinden göç eden Türkler vasıtasıyla yayıldığı öne sürülmüştür (29). Behçet Hastalığı Akdeniz havzasındaki ülkelerde, ortadoğu ve doğu Asya'da özellikle Japonya'da sıktır. Prevalansı Japonya (10- 15:100.000) ve Türkiye'de (%5.3-%7.6) yüksektir. Azizerli ve arkadaşlarının İstanbul'da yaptıkları çalışmada Behçet hastalığı prevalansını 42/10000 olarak bulunmuştur. Yurdakul ve arkadaşları ise kuzeyde Çamaş' da küçük bir alanda yaptıkları çalışmada, Behçet hastalığı görülme sıklığını 37/10.000 olarak bildirmişlerdir (61).

2.1.2. Behçet Hastalığının Genetik Yatkınlığı:

Behçet Hastalığı bilinmeyen etiyolojisi ile kronik inflamatuvar bir bozukluktur. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, hastalığın patogenizinde önemli olduğu uzun zamandır öne sürülmektedir. Son bulgular, Behçet hastalığındaki inflamasyonun doğasını daha iyi tanımlamakta ve genetik faktörlerin önemini desteklemektedir. Moleküler genetik çalışmaları Behçet hastalığı ile HLA-B51 ilişkisini ortaya

koymuştur. HLA-B51 molekülünün asıl patojenik mekanizması bilinmemekte ve Behçet hastalığının genetik yatkınlığı üzerindeki dağılımı %20'den daha az oranda saptanmıştır (36).

Behçet hastalığı, Mendeliyan kalıtım modeli gösteren genetik bir hastalık değildir. Hastaların büyük kısmı aile hikayeleri olmayan sporadik vakalardır. Fakat hastalardaki ailevi dağılım daha önceden bildirilmiştir ve birinci derece akrabalarda artmış risk gözlenmiştir. Türk hastalarda kardeşlerdeki tekrarlama riski %4,2'dir ve Kone-Paunt ve arkadaşları juvenil hastalarda daha artmış olan riski %10 olarak bildirmişleridir. Türkiye'de Behçet hastalığının kardeşlerdeki tekrarlama riski oranları 11,4- 52,5 olarak hesaplanmıştır, bu da güçlü bir genetik yükü işaret eder. Behçet hastalığının HLA-B51 ile olan ilişkisi, patogenezinde genetik faktörlerin yer aldığına dair en destekleyici bulgudur. HLA-B51'in patogenezinde doğrudan bir rolünün olup olmadığı ya da HLA-B lokusuna yakın bir yerde lokalize olan ve Behçet hastalığı için bir yatkınlık geninin bağlantılı olup olmadığı uzun süredir araştırılmaktadır. HLA-B'nin sentromerik bölgesinde lokalize olan tümör nekrozis faktör (TNF) ve lenfotoksin genleri, Behçet hastalığı yatkınlığı için aday genler olarak araştırmacıların ilgisini çekmiştir. TNF ve HLA-B lokusu arasındaki genomik segmentin araştırılması ile, HLA-B'nin 46-kb sentromeriğine yerleşmiş MHC sınıf I zincir ilişkili gen A (MICA)'nın Behçet hastalığı ile güçlü bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Behçet hastalığında artmış olarak bilinen T hücrelerine MICA molekülleri tarafından antijen sunulmasının patojenik mekanizma olabileceği öne sürülmüştür. Fakat intestinal epitelyumda yapılan MICA polimorfizm çalışmasında, MICA moleküllerinin T hücrelerine antijen sunulmasında rolü olmadığı gösterilmiştir (29,90).

Farklı mikrobiyal ajanlardan kaynaklanan Behçet hastalığı ile ilişkilendirilmiş belirli peptidlerin HLA-B51 ile sunulmasının patogenezinde bir mekanizma olabileceği düşünülmüştür. Fakat Behçet hastalığına spesifik olduğu düşünülen peptidler kullanılarak yapılan çalışmalarda bugüne kadar HLA-B51'in rolü gösterilememiştir.

Wildner ve arkadaşları HLA-B27, HLA-B51 ve diğer HLA-B allellerinde ortak olan polimorfik HLA-B dizisi belirlemişlerdir. Bu dizi, retinal çözünebilen antijen (S-Ag) kaynaklı peptid ile amino asit homolojisi gösterir. Bu peptid sıçanlarda anterior üveitisi uyarmıştır ve üveitli hastalarda B27PD kullanılmasının oral toleransa sebep olduğu bildirilmiştir. Kurhan-Yavuz ve arkadaşları, posterior üveitisi Behçet hastalarında B27PD peptidi, retinal S-Ag kaynaklı peptid ve retinal S-Ag'ye karşı artmış T hücre yanıtını göstermişlerdir (29,41).

Ailevi vakalarda yapılan bağlantı analizi çalışmaları sonucunda, HLA-B lokusunun Behçet hastalığına katkısının (λ_{HLA}), toplam genetik yatkınlığın %20'sinden az olduğu görülmüştür (36). HLA genlerinin bulunduğu 6p bölgesinde yapılan incelemeler sonucunda, 6p22-23 bölgesine yeni

bir lokus haritalanmıştır. Ailevi vakalarda tamamlanan tüm genom taramasında, HLA ve 6p22-23 dışında, yeni duyarlılık gen lokusları için kanıtlar sağlamıştır (36). Yakın zamanda yapılan bir diğer tüm genom taraması sonucuna göre yeni aday lokuslar belirlenmiştir. Bu çalışmada KIAA1529 proteinini kodlayan gendeki bir tek nükleotid polimorfizminin (SNP) Behçet hastalığı-risk alleli olabileceği bildirilmiştir (21).

2.1.3. Behçet Hastağında Mikrobiyal Ajanların Rolü:

Behçet hastağında mikrobiyal patojenlerin hastalığa sebep olan ajan ya da tetikleyici faktör olduğu düşünülmektedir. Profesör Behçet, hastalığın viral etiolojisinin olduğunu önermiştir (29). Bu hipotezde dört prensip öne sürülmüştür: (i) viral, (ii) streptokokal, (iii) ısı şoku proteinleri ve (iv) çapraz reaksiyona girebilen veya moleküler taklit protein etiyojileridir (98).

Viral DNA problemlerinin komplementer RNA'ya hibridizasyonu veya polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu ile Behçet hastalarının periferik kan lenfositlerinde *Herpes simplex* virus (HSV) tip I genomunun olduğu gösterilmiştir. Fakat Behçet hastalığı etiolojisinde HSV'nin doğrudan bir rolü olduğu desteklenememiştir (29,75,76).

Behçet hastalarında oral florada artmış oranda *Streptococcus sanguis* kolonileri bulunmuştur. Şu an *S. oralis* olarak tanımlanan *S. sanguis* serotiplerine karşı oluşan antikor yanıtı Behçet hasta serumunda tespit edilmiş ve sağlıklı kontroller ile romatoid artrit hastalarında bulunamamıştır.

İnsan mitokondriyal heat shock protein (hsp) ile belirgin oranda homoloji gösteren farklı mikrobiyal etiyojistik faktörler arasında Behçet hastalığı patogeneğinde hsp'lerin de yer aldığı önerilmiştir. Mikrobiyal hsp'nin belirli epitoplardan, spesifik bir immün yanıtı tetikleyen ve inflamatuvar reaksiyona sebep olan antijenler olduğu öne sürülmüştür. 65 kD mikobakteriyel hsp'nin dört peptidi ve bunlara homolog 60 kD insan hsp'nin peptidleri, T hücre epitop haritalama yöntemleri ile belirlenmiştir. Subkutanöz immunizasyon ile Lewis sıçanlarında hsp peptidleri anterior üveitisi uyardığı gösterilmiştir. En çok üveiti uyaran peptidin 60 kD insan hsp (336- 351) peptidi olduğu belirlenmiştir (16,17,29,80).

Behçet hastalığına sahip Japon hastalarda Kaneko ve arkadaşları, CD4 pozitif T hücrelerinde antijen kaynaklı oligoklonal genişleme bildirmiş ve 60 kD insan hsp (336-351) peptidine immün yanıt oluştuğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu peptide karşı T hücre proliferatif yanıtı ile birlikte oküler lezyonların varlığı da gözlenmiştir. Hsp ile uyarılmış T hücrelerinin, oral mukozal ya da retinal dokular ile çapraz reaksiyona girebildiği çünkü bakteriyel ve öz hsp molekülleri arasında moleküler taklit (molecular mimicry) bulunduğu önerilmiştir (29,35,84).

2.1.4. Behçet Hastalığında İmmunolojik Anormallikler ve Antijen Kaynaklı İmmun Yanıt:

Behçet hastalığının en önemli özelliği non-spesifik olarak artmış inflamatuvar yanıtıdır. Bunun klasik örneği, deriye basitçe iğne batırılmasıyla bir papül ya da püstül gelişimi ile karakterize olan deri paterji reaksiyonudur. Papül gelişimi hastalık süresince de spontan olarak ortaya çıkar.

Behçet hastalığında monosit ve lenfositlerin birçok sitokini artmış oranda eksprese ettiği bildirilmiştir. Genellikle Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış sekresyonu, hastalığın özellikle aktif döneminde belirgindir. Fakat monositlerden IL-1, IL-6 ve IL-8'in artmış sekresyonu inaktif hastalarda da gösterilmiştir. Behçet hastalığında asıl patojenik mekanizma olarak artmış adezyon molekül ekspresyonu, süperoksit oluşumu ve artmış oranda kemotaksis ile nötrofil aktivasyonunun olduğu öne sürülmüştür. Behçet hastalığında nötrofiller, Th1 immün yanıtın oluşmasında önemli rolleri olan IL-12 ve IL-18'i spontan olarak üretirler (23,29,34).

T hücre reseptör (TCR) pozitif hücreler, CD8 pozitif hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından eksprese edilen yeni bir reseptör ailesinin belirlenmesi ile HLA sınıf I moleküllerinin başka fonksiyonları tanımlanmıştır. Bunlar öldürücü immunoglobulin benzeri reseptörlerdir (KIR) ve HLA sınıf I moleküllerinin farklı allelik gruplarında da aynı olan 1-heliks'in 77-83 rezidülerindeki korunmuş epitoplara bağlanır. Bu reseptörlerin bağlanmasının, T hücre aracılı sitotoksinite ve NK hücrelerinin seçici inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Behçet hastalığında HLA-B51'in patojenik rolü, inflamasyon hücreleri üzerinde KIR moleküllerinin etkisini içeren alternatif bir hipotez olabilir (21,29).

Aktif Behçet hastalarında IL-2 ve IFN üreten T hücrelerinin artmış oranda olduğu flow sitometrik analizlerde gösterilmiştir. Buna paralel olarak serumda IL-12'nin yüksek seviyeleri güçlü bir Th1 yanıtının olduğunu destekler. Ayrıca hastalığın kliniksel aktivitesi ile birlikte seyreden oligoklonal T hücre genişlemesi, Behçet hastalığı immunopatogenezinde antijen kaynaklı immün yanıtı gösterir. Behçet hastalığında T hücrelerini uyaran birçok antijen bulunmuştur. T hücreleri streptokokal antijenler tarafından IL-6, IFN ve nötrofilik faktörleri üretmek için uyarılabilir. Ayrıca hsp kaynaklı peptidler de Behçet hastalığında T hücre proliferasyonunu uyarabilir (29,30).

Başka bir hsp olan $\alpha\beta$ -kristalin böbrek epitel hücrelerinde, iskelet kasında ve omurgalı göz lensinde bulunan küçük bir stres proteinidir. Santral sinir sistemindeki glia hücrelerinde strese yanıt olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Nöro-Behçet hastalarında serum ve BOS IgG ve serum IgM antikorlarının $\alpha\beta$ -kristaline yanıt olarak arttığı gözlenmiştir (15).

Behçet hastalığında B hücrelerinin total sayılarının normal sınırlar içinde kalmasına rağmen bazı fonksiyonla anormallikler tespit edilmiştir. Aktif hastalarda spontan olarak immunoglobulin salgılayan B hücreleri, aktive olmuş bellek B hücreleri ile B hücrelerinin IgA izotipi sayıca artmış olarak bulunmuştur. 65 kD mikobakteriyal hsp ile yapılan B hücre epitop haritalama çalışmalarında, T hücre epitopları ile birlikte görülen peptidlere karşı IgA veIgG antikorlarının belirgin oranda artışı gösterilmiştir (29,84).

Behçet Hastalığında otoantijen olarak aday gösterilen HSP70 ve bu antijene karşı oluşan antikorun Behçet Hastalarının serumlarında yüksek titrasyonda bulunduğu yakın zamanda gösterilmiştir. HSP70 in doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtta proinflamatuvar sitokin aktivasyonu ve doku hasarına katılabileceğini belirtilmektedir (79,5).

Behçet hastalığında otoantijen olarak aday gösterilen otoantijenlere, ısı şoku proteinleri ile birlikte anti-endothelial hücre antikor, retinal S antijen, tropomiyosin, kinectin, Sip-1 ve SBP antijenleri de verilebilir (5,14,22,59,77,99). Retinal S antijen retinada ifade edilen ve hastalarda üveit ile ilişkili antikorların geliştirebildiği bir otoantijendir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada Behçet hastalığında retinal-S antijeni Th1 hücre epitop haritalaması yapılmıştır. Belli epitoplara spesifik T-hücre yanıtı belirlenmiştir (92).

2.1.5. Behçet Hastalığının Otoinflamatuvar ve Otoimmün Hastalıklardaki Yeri:

Eksternal ya da internal bir oluşuma karşı doğal immun yanıt saatler içerisinde oluşur; daha güçlü ve daha spesifik yanıtları olan edinsel immun yanıt, T lenfositlerin aktivasyonunu ve hedeflenmiş antikorların gelişimini gerektirdiğinden, daha uzun sürede oluşmaktadır (85).

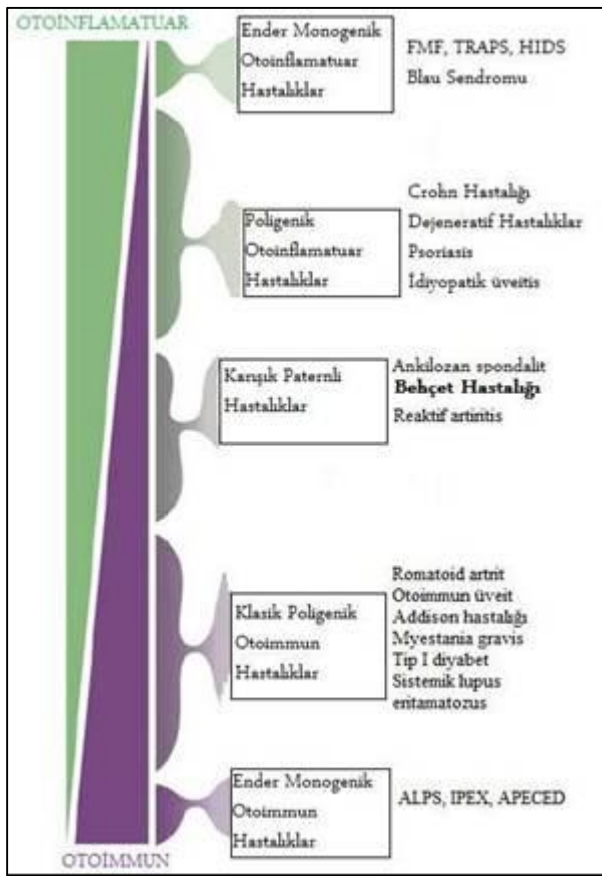
Otoimmünite, öz antijenlere yönelik immun aktivasyon yanıtı geliştirmeyi tanımlar. Öz antijenlere karşı antikor üretilmesi ya da öz antijenlere tepkili T hücrelerinin aktivasyonu sonucu gelişmektedir. Otoimmünitenin gelişmesinde başlıca faktörler; öz toleransın gelişmemesine katkıda bulunabilen yatkınlık genlerinin kalımsal geçişi ve öze tepkili (self-reaktif) lenfositleri aktive eden enfeksiyon gibi çevresel tetikleyicilerdir.

Birçok gen otoimmün hastalığa neden olur, bunlardan en önemlileri MHC genleridir. İnsan ve eş-soyulu hayvanlardaki pek çok otoimmün hastalık belli MHC allelleri ile ilişkilidir. HLA allelleri ile otoimmün hastalıklar arası ilişki çok eskiden beri bilinmektedir. Bazı otoimmün hastalıkların sıklığı belirli bir HLA allelini taşıyanlarda, taşımayanlara oranla çok daha yüksek olarak gözlenmektedir. Bu artmış sıklık HLA-hastalık ilişkisinde 'göreceli risk' olarak tanımlanmaktadır. Burada belirli bir HLA alleli taşımanın o otoimmün hastalığın gelişme riskini

arttırdığı, ancak allelin kendisinin hastalık nedeni olmadığını göz önünde bulundurmak gerekir (1).

Otoinflamasyon, otoimmunitenin uzantısı olarak düşünülebilir (85). Otoinflamasyon, hastalıktan etkilenmiş bölgelerdeki bazı faktörlerin doğal bağışıklık sistemini aktive etmesi sonucu kendi özüne yönlendirilmiş bir doku inflamasyonudur (1).

Behçet hastalığı kompleks etiyolojiye sahip otoinflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çünkü artmış inflamatuvar yanıt ve proinflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonu, diğer otoinflamatuvar hastalıklarda da görülen özelliklerdir.



Şekil 2.1: Behçet hastalığının otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların sınıflandırılması. (Sayılarının çokluğundan dolayı tüm immunolojik hastalıklar alınmamıştır). (48)

Monogenik otoinflamatuvar hastalıklar dokuya spesifik faktörler tarafından belirlenir. Ender monogenik otoimmün durumlarda hastalığın lokalizasyonu, adaptif immün yanıt tarafından belirlenir. İmmunolojik hastalıklardaki klinik heterojenite, otoinflamatuvar ve otoimmün faktörlerin değişken ekspresyonlarını yansıtabilir. Örneğin, insanlarda üveitis için genetik ve moleküler bulgular göz önüne alındığında üveitis, ender monogenik otoimmün hastalıklar hariç her hastalık

kategorisine girebilir. Ayrıca poligenik otoinflamatuvar hastalıklar ile MHC sınıf I ilişkili hastalıklar arasında benzer durumlar bulunur fakat bu sınıflandırmayı basitleştirmek için farklı kategorilere bölünmüştür (48). Ankilozan spondalit ve psoriatik artropati gibi Behçet hastalığı da MHC sınıf I ile ilişkilidir. Fakat ankilozan spondalit ve psoriatik artropatiye zıt olarak Behçet hastalığı klinik özellikleri bakımından çoğunlukla otoinflamatuvar bir yapıya sahiptir. Dahası FMF geni (MEFV) ve TNFRSF1A'nın belirli varyantları, Behçet hastalığı olan insanlarda daha sık görülür. Bu doğrultuda MEFV mutasyonları, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Behçet hastalığı genel olarak örtüşmektedir. Behçet hastalığında iyi tanımlanmamış dokuya özgü faktörlerin sekonder otoimmün yanıtlara yol açabileceği öne sürülmüştür. Behçet Hastalığı otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıkların sınıflandırılmasında karışık paternli hastalıklar kategorisinde yer almaktadır (48). (Şekil 2.1).

2.2. PINK1 Geni ve Fonksiyonları:

PINK1, ökaryotlardaki intraselüler sinyallerin arttırılması ve iletilmesinde rol alan enzimlerden protein kinaz ailesinin bir üyesidir. PINK1, nöronal yaşamsallığı sağlayan ve anahtar rolü oynayan hücresel proteinlere bağlanarak veya direkt olarak fosforilleyerek görev alabilir (50). PINK1, 1p31.1-34.3 kromozom bölgesinde yer almaktadır. Bu bölge endometriyal kanserlerde sıklıkla heterozigote kaybı gözlenen kısımdır (86). Genin ismi, PTEN bulunmayan kanser hücrelerinde tespit edilen, 10. kromozomda bulunan ve tensin homoloğu olan transkript varyantından gelmektedir. PTEN-induced putative kinase adı verilen proteinin, serin/treonin protein kinaz katalitik domain'e sahip olduğu kabul edilmiştir (50). PINK1 proteini *Drosophila melanogaster*'deki CG4523 gen ürünü ile homoloji gösterdiği (amino asit düzeyinde %43 identik) ve *Caenorhabditis elegans*'in hipotetik bir proteini olan EEED8.9 ile homoloji gösterdiği (%31 identik) bulunmuştur. Omurgasızlardaki bu genlerin fonksiyonlarının bilinmemesine rağmen her iki protein de serin/treonin protein kinaz katalitik domain içerir (86).

N-terminalinde mitokondriyal hedef motifi ve Ca/kalmodulin ailesinden serin/treonin kinazlara homoloji gösteren yüksek oranda korunmuş bir kinaz domain bulunduran PINK1 geni, 581 amino asitlik bir protein kodlar (24,43). PINK1'in kinaz özelliği ile oto-fosforile olabildiği de gösterilmiştir. Kinaz aktivitesini düzenleyen mekanizmalardan biri homo-dimerizasyon özelliğidir ve hücrelerde PINK1'in monomer şeklinde bulunmadığı önerilmiştir (43). PINK1 156. ve 509. amino asitleri arasında serin/treonin kinazlara homoloji gösteren korunmuş bir protein kinaz bölgesi içerir (55).

PINK1'in C-terminal bölgesi, protein kinaz bölgesinin dışında yer alan 512'den 581'e kadar olan rezidü kısmıdır. PINK1'in kinaz domain'inde üç tane insert bölgesi bulunur ve yaklaşık olarak 81 rezidüden oluşur. Bu insert bölgelerinin, PINK1'in substrat seçiciliğini ve kinaz aktivitesini sağlayan regülatör motifler içerdiği tahmin edilmektedir. N-terminal bölgesi kırpılabilen, mitokondriye hedefleyici bir dizi içerir. PINK1'in kırılması ilk 100 rezidüden olur ve N-terminalindeki 34 veya 77 amino asitlik bölge mitokondriyal hedefleme için yeterlidir fakat mitokondriye giriş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. PINK1'in mitokondriye lokalize olabildiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda PINK1 proteininin N-terminalindeki 135 rezidünün yukarısında kırılmaya uğradığı öne sürülmüştür. Transfeksiyon çalışmalarında PINK1'in ilk 34 amino asitlik bölümünün mitokondriye başarılı bir şekilde hedeflendiği gösterilmiş ve bu bölgenin mitokondriyi hedeflemede yeterli olduğu bildirilmiştir. Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalarda tam uzunluktaki (full length) PINK1 proteininin (66 kD) ve proteolitik olarak işlenmiş iki formunun (55kD ve 46 kD) varlığı gösterilmiştir. Bu durum PINK1'in birçok bölgeden proteolitik kırılmaya uğradığını destekler (50,73).

PINK1'in mitokondriyal translokasyonu, N-terminalinde bulunan 34 amino asitlik bir hedefleyici motif aracılığıyla olur fakat mitokondriye giriş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. PINK1'in mitokondriye lokalize olabildiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda PINK1 proteininin N-terminalindeki 135 rezidünün yukarısında kırılmaya uğradığı öne sürülmüştür. Transfeksiyon çalışmalarında PINK1'in ilk 34 amino asitlik bölümünün mitokondriye başarılı bir şekilde hedeflendiği gösterilmiş ve bu bölgenin mitokondriyi hedeflemede yeterli olduğu bildirilmiştir (55).

PINK1 mRNA'sı en çok kalp, kas ve testislerde olmak üzere birçok insan dokusunda eksprese edilir, bu yüzden hücrede yararlı rollerinin olduğu düşünülmektedir (94).

Vahşi tip (Wild-type) PINK1'in, apoptoza ve proteozomal inhibisyona karşı hücreleri koruduğu ve böylece PINK1 proteininin nöroprotektif bir rolünün olabileceği, yapılan fonksiyonel çalışmalarda gösterilmiştir. PINK1'in bu koruyucu etkisi gendeki mutasyonlarla ortadan kalkmaktadır. Fakat Parkinson hastalığında belirlenen heterozigot PINK1 mutasyonları, in vivo olarak genin ekspresyonunu veya proteinin lokalizasyonunu değiştirmemektedir (24,45,82,91).

Erken dönemde ortaya çıkan ailesel Parkinson hastalarında yapılan genetik haritalama çalışmalarında PARK olarak adlandırılan (PARK1-13) bazı genlerde mutasyonlar bulunmuştur. PARK genlerinden bazıları alfa-synuclein (PARK1), Parkin (PARK2), DJ-1 (PARK3)'ü kodlar. PARK6 otozomal resesif Parkinsonizm, 1. kromozomda bulunan ve PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)'i kodlayan gen ile ilişkilendirilmiştir (31,50). PINK1 gen lokusundaki

homozigot ve heterozigot mutasyonlar, PARK6 ailesel Parkinsonizm'e sebep olur (87). Otozomal resesif olan ve erken ortaya çıkan Parkinson hastalığındaki PINK1 mutasyonlarının prevalansı %0-15'tir. PINK1 genindeki patojenik mutasyonların büyük bir çoğunluğu kinaz aktivitesini etkileyen, delesyon, missense ve nonsense mutasyonları içeren kinaz domain'de bulunur. Buna bağlı olarak patojenik mutasyonlar olan G309D, L437P, G386A, G409V için azalmış kinaz aktivitesi gösterilmiştir (39,94). Ayrıca PINK1'in Parkinson hastası beyinde oluşan Lewy cisimciklerinin %5-10'unda bulunduğu ve proteozomal inhibisyon sırasında PINK1'in agrezomlara lokalize olduğu gösterilmiştir (55,78).

PINK1'in mitokondrideki fonksiyonel rolü bilinmemektedir ve lokalizasyon bilgileri PINK1'in hem mitokondriye hem de sitozole lokalize olduğunu göstermektedir. PINK1'in sitozolik lokalizasyonu, proteozom aktivitesi inhibe olduğunda ubiquitin'lenip birikmesine dayandırılmaktadır. Prekürsör PINK1'in mitokondri ile ilişkili olduğu ve kırılmış formlarının daha çok sitozolde bulunduğu bildirilmiştir (6). PINK1 kırılmasından sorumlu olan proteazın bilinmemesine rağmen kırılmanın proteozomal stres ile up-regüle edildiği önerilmiştir. Alternatif olarak, proteozomal stres ile tetiklenen apoptoz sırasında aktive olan proteazlar tarafından da kırılma gerçekleşebilir (4,72).

Prekürsör PINK1'in işlenmesi için belli bir mitokondriyal membran potansiyeli gerekmektedir ve kırılmış sitozolik formlarının stabilizasyonu için de Hsp90 aktivitesi gerekmektedir. Hsp90 total hücrel proteinin %1-2'sini oluşturan önemli bir sitozolik şaperon proteindir (41). Hedef proteinlerinin stabilizasyonunu, proteozom sistemiyle gerçekleşen protein degradasyonunu önleyerek sağlar (52,53). PINK1'in Hsp90 ile olan ilişkisini kaybetmesi sonucu proteozomla sağlanan PINK1'in degradasyonu gerçekleşir. PINK1'in Hsp90 ile ilişkisi sonucu PINK1 stabilizasyonu sağlanır ve Hsp90 aktivitesinin kaybı, PINK1 seviyesinin azalmasına yol açar. Bu etkileşim PINK1'in sitozolik formunun da fonksiyon gördüğü yönündedir (42).

Ubiquitin-proteozom sistemi (UPS), proteinlerin ilk etapta poliubiquitin zinciri ile işaretlenip daha sonra 26S proteozom tarafından degradasyona yönlendirildiği, sıkı bir şekilde regüle edilen ardışık basamaklardan oluşur. Poliubiquitin zincirinin kovalent bağlanması, E1, E2 ve E3 denilen bir seri ubiquitin ligazlara bağımlıdır. Bu ligazlar ubiquitin'i ATP'ye bağımlı bir şekilde substratlara bağlarlar. İşaretlenmiş proteinler daha sonra 26S proteozom tarafından hızlı bir şekilde degrade edilir. PINK1 miktarının azalması veya mutasyonları sonucunda proteozom fonksiyonunun zayıfladığı gösterilmiştir (43).

Yapılan dizi analizleri sonucunda PINK1 kinazın iki substratı belirlenmiştir. Bunlardan biri olan Parkin, E3 ligaz aktivitesi gösteren bir protein kodlar ve birçok proteinin

ubiquitin'lenmesine aracılık edip degradasyonunu sağlar. Diğer bir substrat olan DJ-1'nin oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu transfekste edilmiş hücrelerde ve *Drosophila*'da gösterilmiştir. Parkin, DJ-1 ve PINK1'nin PPD kompleks adı verilen bir kompleks oluşturduğu ve daha çok sitozolde bulunduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir.

Parkin, ubiquitin-proteozom sisteminde E3 protein ligaz olarak fonksiyon görür. Son yapılan çalışmalarda PINK1, Parkin substratlarından olan Parkin ve synphilin-1'in ubiquitin'lenmesini sağlayarak degradasyonlarını gerçekleştirir, denilmektedir. PPD kompleksinde Parkin substratlara bağlanırken PINK1 ve DJ-1 regülatör olarak rol oynar. PINK1, PPD kompleksinin kinaz subünitesi bulunduran ilk E3 ligaz kompleksi olmasını sağlar. Bu kompleksdeki PINK1'in serin/treonin kinaz aktivitesinin rolü bilinmese de komplekste bulunan yapıları ya da substratları fosforilleyerek protein ubiquitin'lenmesini düzenlediği düşünülmektedir. Ayrıca PPD kompleksinin, nöronlarda oksidatif stresle indüklenen yanlış katlanmış ya da katlanmamış Parkin substratlarını degrade eden bir kalite kontrol mekanizması olduğu şeklinde açıklanmaktadır (9,60,95).

PINK1 içermeyen sineklerde yapılan çalışmalarda erkek sterilitesi, apoptotik kas dejenerasyonu, mitokondriyal morfolojide defektler ve oksidatif stres dahil birçok strese karşı artmış hassasiyet gösterilmiştir (3,26,52).

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sisteminin kinazlar tarafından regüle edildiği bilinmektedir. PINK1 kaybı ya da mutasyonu sonucu mitokondriyal solunum ve ATP sentezinin azaldığı bulunmuştur. Moleküler detaylarının aydınlatılamamış olmasına rağmen, elektron transport zincirinin fosforilasyon düzeyindeki değişikliklerden kaynaklanan defektlere PINK1'in aracılık ettiği düşünülmektedir. Mitokondriyal komplekslerin bir çok subünitesinin fosfo-proteinler olduğu bilindiğinden aktiviteleri, PINK1 mekanizması yoluyla regüle ediliyor olabilir (12,23,43).

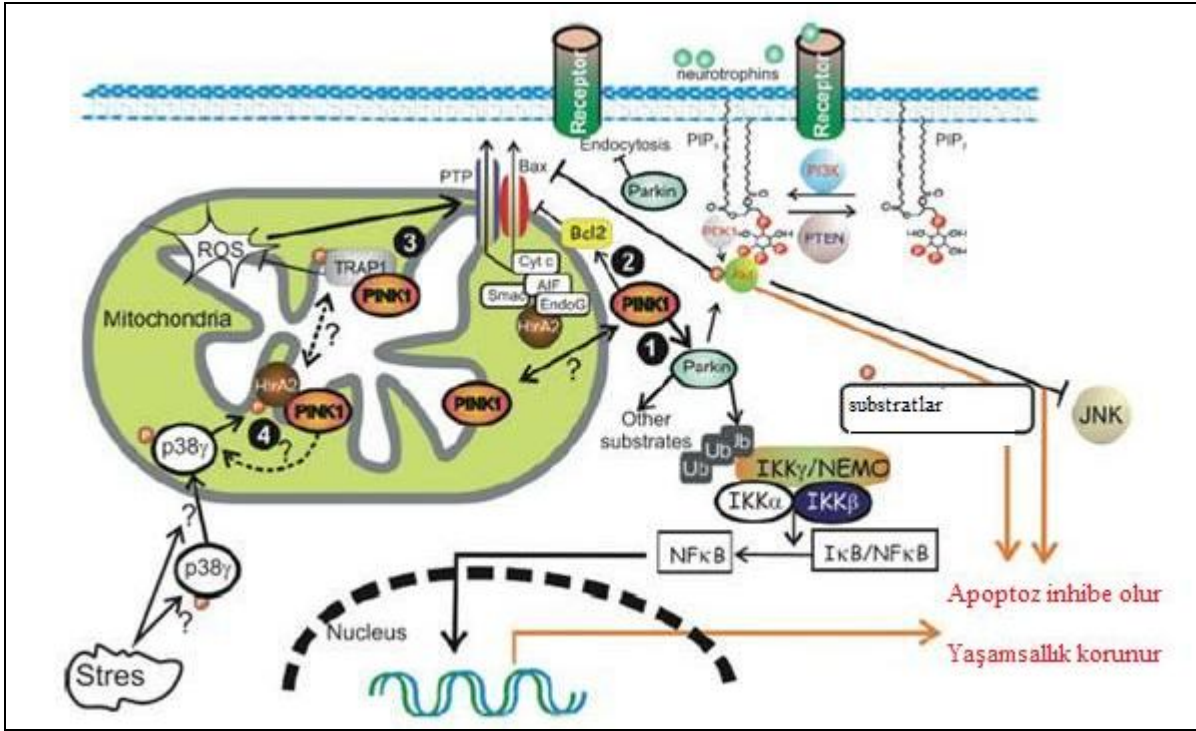
N-terminalinde bulunan mitokondriyal hedefleyici motif PINK1'in mitokondriye lokalizasyonunu gerçekleştirir. PINK1 membrandaki geçirgenliği sağlayan porların açılması ve elektron transport zinciri gibi apoptoz ile ilişkili mitokondriyal olayların düzenlenmesinde potansiyel bir adaydır. Kültüre edilmiş memeli hücreleri ve hayvan modellerindeki bulgular PINK1'in, Parkin ve HtrA2 ile etkileştiğini destekler (50,62).

PINK1'in Parkin'den başka bir aday efektörü, mitokondriyal intermembran bölgede yer alan serin proteaz HtrA2'dir. Apoptotik uyarıyı takiben HtrA2 mitokondriden sitozole salınır ve burada apoptotik proteinlerin inhibitörlerine bağlanır. Bu sayede kaspazların inhibe edilmesi ortadan kalkar ve apoptoz uyarılır. PINK1'in HtrA2'ye bağlanmasıyla mitokondride PINK1-

HtrA2 kompleksi oluşur. Bu bağlanma HtrA2'nin stresle aktive olan kinaz p38γ tarafından Ser142'den fosforillenmesini arttırır. PINK1'in HtrA2 ve p38γ'yi direkt olarak fosforillediği bilinmese de PINK1'in kinaz aktivitesi, HtrA2'nin fosforilasyonunu arttırmak için gereklidir (50). PINK1'den yoksun nöroblastoma hücre soylarında yapılan çalışmalarda mitokondriye olan Bax translokasyonu ve sitoplazmaya sitokrom c salımı olayları, kontrol grubundan daha önce gerçekleşmiş ve caspase aktivasyonunun artmasıyla sonuçlanmıştır. Bu da caspase-3 aracılı nöronal apoptozu önlemede PINK1'in gerekliliğini göstermiştir. Tümör hücre soylarında da wild-type PINK1'in over-ekspresyonu sonucu, stres sırasında caspase-3 aktivasyonunun ve mitokondriden sitokrom c salımının önlediği gösterilmiştir (64,92,94). Ayrıca sitokrom c gibi hücre ölümünün düzenlenmesinde yer alan mitokondriyal proteinlerin salınmasını inhibe etmek için Bcl-2 ile etkileştiği de tespit edilmiştir (50,96).

Hücre soylarında wild-type PINK1'in, proteozomal strese yanıt olarak mitokondriyal membran depolarizasyonundan hücreleri koruduğu bulunmuştur. PINK1 defektinin, insan nöronlarındaki membran potansiyelinin azalması ile sonuçlandığı gösterilmiş; bu da stres yokluğunda bile membran potansiyelinin ayarlanmasında PINK1'in rolü olduğuna işaret eder (10,70).

İnsan nöron çalışmalarında, PINK1'in yokluğunda mitokondride ve sitoplazmada reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı tespit edilmiştir. PINK1'in ROS oluşumunun önlenmesi ve membran potansiyeli üzerindeki koruyucu etkisinin, tümör nekrozis faktör ilişkili protein-1 (TRAP1)'in fosforilasyonu yolu ile gerçekleştiriyor olabilir. TRAP1 (Hsp75) ATP bağlayan moleküler bir şaperon olup mitokondride PINK1 ile birlikte yer alır ve in vitro olarak PINK1 tarafından fosforillendiği gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde TRAP1'in susturulmasıyla membran potansiyelinin kaybı, hücre içi ROS oluşumunun artması ve sitokrom c salımı gibi aynı PINK1'in susturulması sonucu gelişen olaylar meydana gelmiştir (47,94). PINK1'in artmış ekspresyonuyla TRAP1 fosforilasyonu artar ve PINK1 için siRNA kullanılarak yapılan çalışmalarda PINK1'in baskılanmasıyla TRAP1 fosforilasyonu anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar TRAP1'in, bir PINK1 substratı olduğunu ve oksidatif stresle PINK1'in TRAP1 fosforillenmesini arttırdığını gösterir (50,65).



Şekil 2.2: PINK1'in mitokondri ve sitozolde etkileştiği proteinlerin şematik gösterimi (50).

PINK1 ile ilişkili, mitokondri içerisinde farklı bölgelerde lokalize olan proteinlerin belirlenmesi, PINK1'in bir çok fonksiyonel rolünün olabileceğini öne sürmektedir. Atipik bir GTPase olan Miro ve adaptör proteini Milton, sitozole bakacak şekilde mitokondrinin dış membranına tutunmuş bir protein kompleksinin parçası olarak bilinmektedir. Bu kompleksin, mitokondrinin aksonal tranportu için, kinesinin ağır zincirini mikrotübüllerle beraber mitokondriye bağladığı *Drosophila*'da gösterilmiştir. PINK1'in bu protein kompleksinin bir parçası olduğu ve mitokondriyal trafiği düzenlemede rol aldığı gösterilmiştir (93).

PINK1'in fisyon/füzyon yolağı ile mitokondriyal fonksiyonu ve morfogenezini düzenlediği belirtilmiştir. Mitokondriyal fisyon ve füzyon membranın yeniden modellenme işlemleridir ve mitokondrideki işlem ağının yapısını ve dağılımının dinamik değişikliklerini kontrol eder. PINK1'in, mitokondriyal fisyonu Fis-1 ve Drp-1 proteinleri ile regüle ettiği; Drp-1 ve PINK1 arasındaki ilişkinin aracı bir protein olan Fis-1 ile koordine edildiği gösterilmiştir. Memelilerdeki PINK1'in mitokondriyal fisyon mekanizmasındaki komponentler ile etkileştiği ve *Drosophila*'daki benzer bir mekanizmayla fisyon/füzyonu düzenlediği bildirilmiştir. Bu bulgu PINK1'in mitokondriyal morfogenezde korunmuş bir rolünün olduğunu destekler (97).

Yapılan bir çalışmada FOXO ailesinin bir üyesi olan FOXO3a'nın, büyüme faktörlerinin azalması durumunda PINK1 transkripsiyonunu kontrol ettiği bulunmuştur. Forkhead box,

subgroup O (FOXO) transkripsiyon faktörleri, farklı hücre dışı sinyallere yanıt olarak biyolojik fonksiyonlara sahiptir. FOXO faktörlerinin, oksidatif stresle indüklenen hücre ölümüne karşı hücreleri korumada evrimsel olarak korunmuş rolleri vardır. PINK1'in, FOXO3a için önemli bir hedef olduğu ve transkripsiyon faktörlerinin bu ailesinin anti-oksidatif stres fonksiyonlarına aracılık ettiği öne sürülmüştür (49).

Dopaminerjik hücre soylarında PINK1 için siRNA kullanılarak yapılan çalışmalar, mitokondriyal fonksiyonun ileri derecede kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu durum ATP sentezinin azalmasına, oksidatif strese karşı hassasiyete ve apoptoza yol açar. Dahası PINK1 eksprese etmeyen *Drosophila*'da mitokondriyal DNA (mtDNA) sentezinin azaldığı bildirilmiştir. Fakat mtDNA seviyelerinin azalmasına rağmen mtDNA tarafından kodlanan sub-ünitelerin transkripsiyonu ve translasyonu etkilenmemiştir. Mitokondriyal DNA sentezinde ve tamirinde yer alan DNA polimeraz- γ 'nın, PINK1 ile etkileşimde bulunabileceği öne sürülmüştür. Yine de PINK1'in mtDNA'yı nasıl etkilediği kesin değildir (25).

2.3. SWAP70 Geni ve Fonksiyonları:

SWAP70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm (switch) bölgesi substratları arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (7). Borggreffe ve arkadaşları, dönüşüme uğrayan B hücreleri için spesifik bir rekombinasyon aktivitesine sahip olan ve dönüşüm (S) bölgesi substratlarını tercih eden bir protein kompleksini izole etmiş ve bunu da SWAP olarak adlandırmışlardır. Bu komplekste B23, C23, PARP proteinleri ile 70 kilo daltonluk SWAP70 proteini yer almaktadır. SWAP70 protein ekspresyonu, dönüşüm gösteren B hücre soylarında ve dönüşüm için uyarılmış B lenfositlerinde bulunmuştur. DNA'ya karşı zayıf bir afinitesi olan, ATP bağlayan ve B23, C23, PARP ile yüksek afiniteli kompleksler oluşturan SWAP70 nükleer bir proteindir (8).

SWAP70 N-terminalinde kalsiyum iyonu bağlayan EF-hand motifi, merkezinde plekstrin homoloji (PH) domaini, üç tane nükleer lokalizasyon sinyali, nükleer eksport sinyali, Dbl homoloji domaini ve C-terminalinde 'coiled-coil' bölgesi bulunmaktadır (27,89).

Timus ve kemik iliğinde zayıf bir şekilde eksprese olan SWAP70'in, dönüşüm (switch) için uyarılmış dalak hücrelerinde SWAP70 RNA'sının belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. SWAP70, kemik iliğindeki erken dönem B hücrelerinde tespit edilememiştir. Aktive olmuş B hücre nükleusuna lokalize olduğu, ayrıca sitoplazmada da bulunabildiği belirlenmiş fakat kromatin ile sıkı bir ilişkisi gözlenmemiştir (7,38,66). Timus ve kemik iliğinde zayıf bir şekilde eksprese olan SWAP70'in, dönüşüm (switch) için uyarılmış dalak hücrelerinde SWAP70

RNA'sının belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. SWAP70, kemik iliğindeki erken dönem B hücrelerinde tespit edilememiştir. Aktive olmuş B hücre nükleusuna lokalize olduğu, ayrıca sitoplazmada da bulunabildiği belirlenmiş fakat kromatin ile sıkı bir ilişkisi gözlenmemiştir (8,69,74).

Bir immunoglobulin molekülünün sınıfını belirleyen ağır zincirinin sabit (C) bölgesidir. Antijen uyarısı ile erken dönem IgM sınıfının ekspresyonu genellikle başka bir sınıfa (IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE ve IgA) doğru değişir. DNA düzeyinde bu olay, C sabit bölgenin 5' intron bölümünde yer alan dönüşüm (switch, S) bölgesi ile eksprese olacak belli bir C-gen segmentinin 5' intron bölümünde yer alan başka bir dönüşüm (S) bölgesi arasındaki DNA transferini içeren bir rekombinasyondur. S bölgeleri birden fazla kilobaz uzunluğunda olup kısa ve G'den zengin tekrarlayıcı diziler içerir. 'Stem loop' gibi sekonder yapılar alabilirler ve bir çok kırılma noktası bu yapılarda bulunur. V(D)J re-araşmanlarında gözlenenlere zıt olarak dönüşüm (S) rekombinasyonlarının kırılma ve birleşme noktaları belirli değildir. Tüm S bölgesi boyunca ya da S bölgesi dışında bile bulunabilirler (8). Bu rekombinasyon olayları, bir çok ajan tarafından (yardımcı T hücreleri, limfokinler, lipopolisakkarid veya CD40 reseptörüne bağlanan antikolar) B lenfositlerinde uyarılabilir. Farklı ajanlar ya da bunların kombinasyonları, dönüşümü başka bir sınıfa doğru yönlendirir. Sınıf dönüşümü rekombinasyonuna aracılık eden proteinleri belirlemek için yapılan hücreden bağımsız DNA rekombinasyon deneyinde aktif B hücreleri için spesifik olan ve dönüşüm (S) bölgesindeki DNA substratlarını tercih eden bir protein kompleksi bulunmuş ve SWAP olarak adlandırılmıştır. Şu ana kadar beş SWAP komponenti bulunmuştur: poli(ADP-riboz)polimeraz, protein C23 (nükleolin), protein B23 (nükleofosmin), DNA-PK ve SWAP70. SWAP kompleksindeki diğer komponentlerle sıkı bir etkileşime girdiğinden SWAP70'in bu komplekste bir arada tutucu bir rolü olduğu düşünülmektedir.

SWAP70 proteini, sınıf dönüşümü için belirli bir Ig izotipinde spesifik bir ekspresyon göstermemektedir. SWAP70 ekspresyonunun p53'e bağımlı olmadığı ve DNA tamir yolları ya da V(D)J rekombinasyonu ile birlikte uyarılmadığı bildirilmiştir.

Northern blot analizlerinde sınıf dönüşümü için uyarılmış dalak hücrelerinde SWAP70 RNA'sı güçlü bir şekilde artış göstermiş ve uyarılmamış dalakta ise zayıf bir sinyal kaydedilmiştir. Timus ve kemik iliğinde yapılan çalışmalarda SWAP70 RNA'sına çok az bir seviyede rastlanmış; bu da erken dönem B lenfosit ve T lenfositlerin çok nadir SWAP70 RNA'sı eksprese ettiğini göstermektedir. Dalaktan kemik iliğine transfer olan B hücrelerinin bu esnada apoptozu gerçekleşir; sadece %10-20'si hayatta kalır. Bu olayda dalaktaki B hücrelerinin SWAP70 eksprese edenlerinin seçildiği düşünülmektedir. Dalağın özellikle germinal

merkezindeki B hücrelerinde güçlü bir şekilde eksprese olur fakat hücre proliferasyonu ile doğrudan bir ilişkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (7,40,54).

SWAP70 proteini birçok hücre çeşidinde az sıklıkta eksprese edilirken, olgunlaşmamış mast hücrelerinde ve aktif B hücrelerinde oldukça fazla oranda eksprese edilir. SWAP70 knock-out fare modellerinde B lenfositlerinin γ -irradiasyonuna daha hassas hale geldiği ve kontrol grubundan daha fazla oranda otoimmün antikorlar geliştirdiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada CD40'a bağımlı IgE izotipine dönüşüm olayını da etkilemiştir (27,46).

SWAP70 proteini üç tane nükleer lokalizasyon sinyali içermektedir ve hem nukleusta hem de sitoplazmada varlığı gösterilmiştir. Fakat nükleer yapılara ya da kromatine karşı zayıf bir afinitesi bulunmaktadır (7). B hücrelerinin aktivasyonu ile SWAP70 sitoplazmadan membrana doğru lokalize olur ve burada B hücre reseptörleri ile ilişki kurar. B hücre nukleusunda DNA tamir proteinleri de olmak üzere birçok proteinle etkileşime geçer. Bu yüzden SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu ve nükleer olayları aktive edebileceği, ayrıca membran ya da sitoplazma sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (63,89).

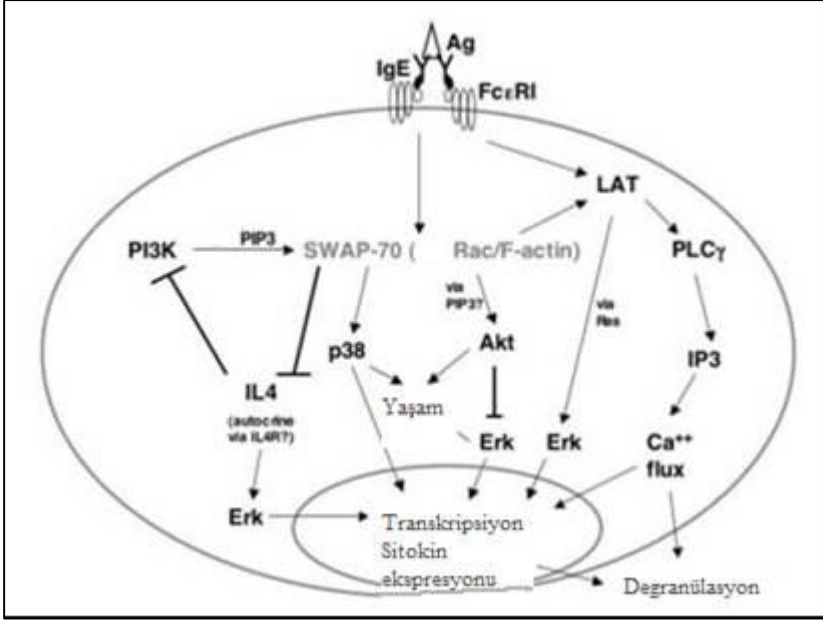
Bazı hücreler büyüme faktörü uyarısının ardından membran dalgalanmaları (membrane ruffles) gösterirler. Büyüme faktörü reseptörünün sinyal uyarısını takiben membran dalgalanmalarına küçük bir G proteini olan Rac'ın aracı olduğu gösterilmiştir (7,71). SWAP70, aderent hücrelerde sitoplazmaya lokalize olduğu ve büyüme faktörü uyarısının ardından membran dalgalarına transloke olduğu gösterilmiştir. Bu olay SWAP70'in PH domaini ile PtdIns(3,4,5)P3 etkileşimi ile gerçekleşir ve aktin filamentleri ile birlikte lokalize olur. SWAP70'in PtdIns(3,4,5)P3 bağımlı Rac guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) olabileceği önerilmiştir. SWAP70 efektör 'loop' ile aktive olmuş Rac1'e bağlanıyor olabilir (5,27,30).

SWAP70 N-terminalinde EF-hand motifi, merkezinde plekstrin homoloji (PH) domaini ve C-terminalinde 'coiled-coil' bölgesi bulunmaktadır. PH domain'leri fosfoinozitidleri bağlayabilme özellikleri ile 100-120 amino asitlik protein modülleridir. Tüm PH domain'leri bir α -heliks ve yedi β -sheet içeren aynı ortak yapıya sahiptir. Pozitif yüklü yüzleri fosfoinozitid bağlama bölgesine bakacak şekilde elektrostatik olarak polarize olmuş durumdadırlar. Bu domain'lerin en iyi tanımlanmış rolleri proteinlerin membrana yönlendirilmesidir. PH domain'in ilk 'loop'undaki pozitif yüklü amino asitlerin, SWAP70'in PtdIns(3,4,5)P3'a bağlanma aktivitesinde önemli olduğu ve bu bağlanma aktivitesinin proteinin biyolojik fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. PtdIns(3,4,5)P3'ı bağlama aktivitesi ile SWAP70 sitozolden plazma membranına lokalize olur, aşırı ekspresyonu ile membran dalgalanmaları da artar (27, 32, 33).

SWAP70'in ekspresyonu aktive olmuş B hücrelerinin dışında kandan köken alan mast hücreleri ve kemik iliğinden köken alan mast hücrelerinde de bulunmuştur. Fakat burada büyük oranda sitoplazmaya lokalize olarak bulunmuş; içerdiği nükleer lokalizasyon sinyallerine rağmen nükleusta tespit edilememiştir. Bu durumda nükleer sinyallerinin inaktive olduğu ya da SWAP70'in nükleusta maskelendiği düşünülmüş ve bununla birlikte hücre içindeki lokalizasyonunun hücreye spesifik olduğu önerilmiştir (60,89).

Mast hücreleri kemik iliğinde öncül kök hücrelerinden köken alan özelleşmiş hematopoietik hücrelerdir. Mast hücrelerinin immun sistemde önemli ve spesifik fonksiyonları bulunur. En iyi bilinen özellikleri IgE ile tetiklenen alerjik reaksiyonlara aracılık etmeleridir. Mast hücreleri, IgE için yüksek afiniteli reseptör (FcεRI) eksprese ederler ve buna IgE bağlanmasıyla gerçekleşen uyarının ardından histamin, proteoglikanlar, proteazlar ve serotonin gibi biyolojik olarak aktif mediyatörler salınır. FcεRI reseptörünün γ -zincirleri ITAM denilen immunoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri içerir. B reseptör komplekleri gibi diğer ITAM içeren immunoreseptörlerin aktivasyon mekanizmasına benzer bir şekilde FcεRI'de sinyal yolları devreye girer. SWAP70 knock-out farelerde yapılan başka bir çalışmada mast hücrelerinin kontrol grubundakilere kıyasla daha az sayıda olduğu bulunmuş fakat bu mast hücrelerinin olgunlaştıktan sonra degranülasyon ile FcεRI çapraz bağlanmasına yanıt verebildikleri tespit edilmiştir. Wild-type mast hücreleri, IgE ya da anti-IgE olmadan degranülasyon göstermemiş fakat IgE ya da anti-IgE ile tetiklendiğinde degranülasyon gösterdikleri bildirilmiştir. Buna zıt olarak IgE ya da anti-IgE ile tetiklenmiş olmasına rağmen SWAP70 içermeyen mast hücrelerinin degranülasyonu %15 oranında azalmıştır. Böylece SWAP70'in degranülasyon için gerekli olduğu ve ilgili olan sinyal yolağında yer aldığı düşünülmüştür (6, 28, 89).

Mast hücrelerinin degranülasyonu için gerekli olan FcεRI çapraz bağlanmasını takip eden olaylar LAT aktivasyonu, PtdIns(3,4,5)P3 ve fosfoinozitol-3-fosfat (PIP3) üretimi, ayrıca Akt, p38, ERK gibi kinazların aktivasyonudur. Yapılan bir çalışmada LAT, Akt, ERK, p38 aktivasyonu, IP3 ve PIP3 üretiminde ve sitokin gen ekspresyonunun regülasyonunda SWAP70'in rollerinin olduğu bildirilmiştir (10,74). (Şekil 2.3).



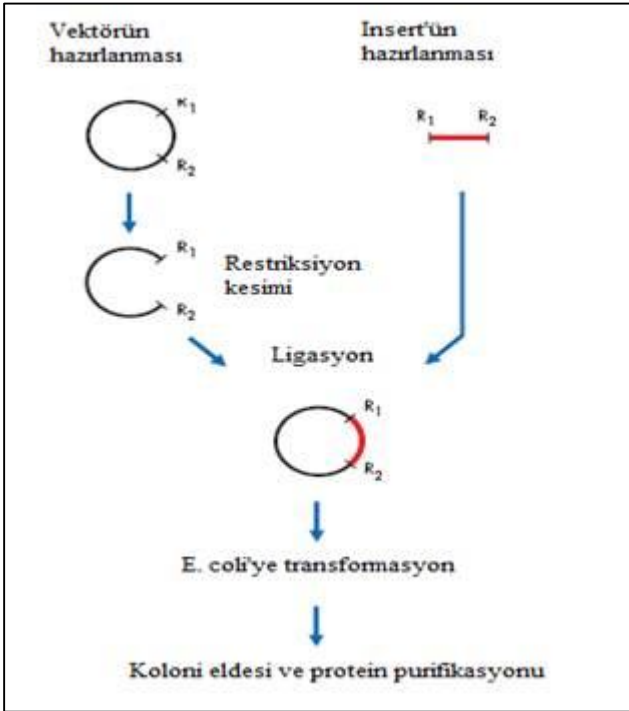
Şekil 2.3 : Mast hücre FcεRI sinyalizasyonunda SWAP70 fonksiyonunun şematik gösterimi (21).

Yapılan bir çalışmada SWAP70 knock-out, aktif dendritik hücrelerin plazma membranında MHCII moleküllerini düzgün bir şekilde lokalize edemediği bildirilmiştir. Uyarılmış dendritik hücreler olgunlaşırlar ve T hücrelerine öncüllük etmek üzere lenfoid organlara göç ederler. Dendritik hücrelerin olgunlaşması, yüzeylerinde MHCII moleküllerinin lokalizasyonu ile antijen sunma kapasitelerine bağlıdır. MHCII yüzey lokalizasyonu için RhoGTPazlar gereklidir. SWAP70, F-actin ve Rac'a bağlanabildiği gibi aynı zamanda RhoA-GTP'ye de bağlanır. RhoA/RhoB regülasyonu ile SWAP70, dendritik hücre bağımlı immün yanıtlarda önemli bir eleman olan MHCII'nin yüzey lokalizasyonunu kontrol eden yeni bir yolağı tanımlar. Peptid yüklenmiş MHCII moleküllerinin plazma membranına transportu, endozomal kompartmanların trafiğini kontrol eden mekanizmalar (örneğin, F-actin sitoskeletoninin regülasyonu ile küçük GTPazların Rho ailesi) tarafından düzenlenir. SWAP70 knock-out edilmiş aktif dendritik hücrelerin MHCII moleküllerini doğru bir şekilde lokalize edemediği fakat sitoplazmik membranda total miktarın değişmediği bildirilmiştir. Bunu takiben, SWAP70 knock-out dendritik hücrelerin in vitro ve in vivo olarak CD4+ T hücrelerini düzgün bir şekilde aktive edemediği gösterilmiştir. Dendritik hücre lizatlarında SWAP70'in aktif Rac1 formu ve RhoA ile etkileştiği fakat RhoB ile etkileşime girmediği tespit edilmiştir. Dendritik hücre uyarılması olmadan da SWAP70 knock-out dendritik hücrede RhoA ve RhoB'nin aktif halde bulunabildiği gösterilmiştir. Dendritik hücre aktivasyonu öncesinde prematür Rho aktivasyonu için MHCII yüzey lokalizasyonunun düzenlenmesi gereklidir. Bu durum RhoA ve RhoB'nin regüle edilmesi ile SWAP70 tarafından MHCII kontrolü için yeni bir mekanizmayı işaret eder (58).

2.4. PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanması ve Protein Ekspresyonu:

DETAE Genetik A.D'da yürütülen ve TÜBİTAK tarafından desteklenen (Proje No:105S112) Vural ve arkadaşlarının yapmış olduğu projede, Behçet hastalığının patogenezinin belirlenmesine yönelik SEREX yöntemi ile yapılan çalışmalarda insan testis cDNA kütüphanesi, Behçet hastalarının serum havuzunda taranmıştır. Serum havuzu taramalarında altı pozitif klon belirlenmiştir. Dizileme sonuçlarına göre bunların beş tanesi bilinen genlerdir (88). PINK1 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının sadece Behçet hastalarında görülmesi PINK1'in Behçet hastalığında yeni bir aday belirteç olabileceğini ortaya koymaktadır. SWAP70 antikor varlığının Behçet hasta alt gruplarından vasküler tutulum ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Behçet patogenezi açısından anlamlı olduğu düşünülen PINK1 ve SWAP70 antijenlerinin, daha fazla örnekte ve daha hızlı taranabilmesi için, proteinlerin sentezlenerek ELISA yöntemi ile taranması da çalışmamızın bir sonraki aşaması olduğu düşünülmüştür.

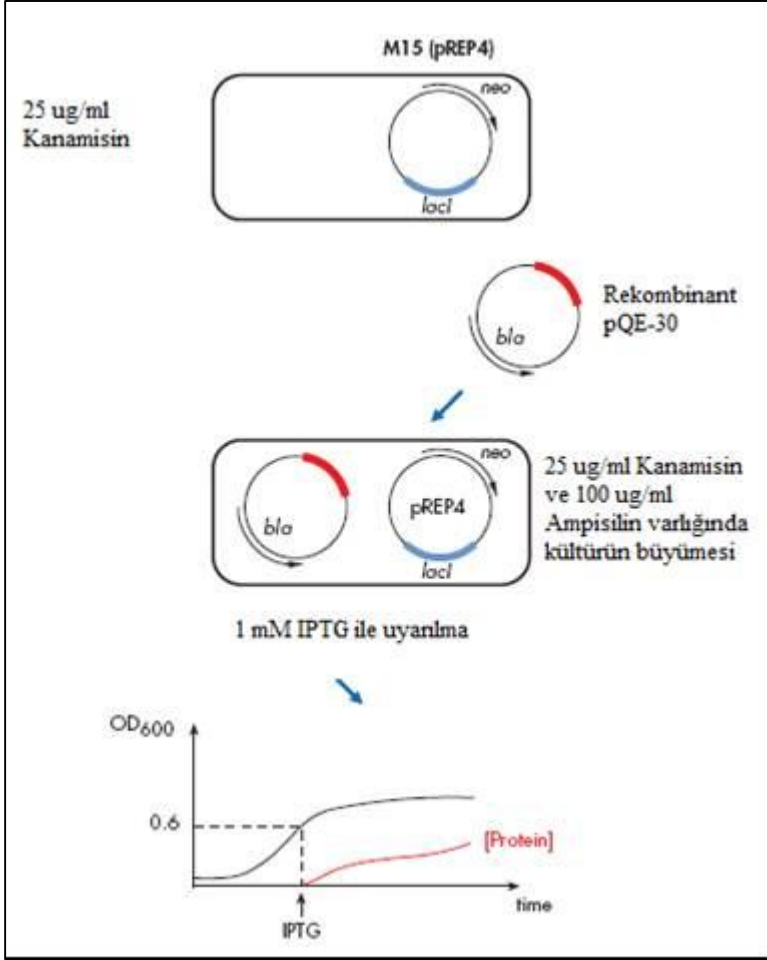
Bu çalışmada ELISA deneylerinde kullanılmak üzere PINK1 ve SWAP70 genleri klonlanarak ekspresyonlarının gerçekleştirildi. PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanması dair basamaklar özetlenerek Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4.: Klonlama basamakları (83)

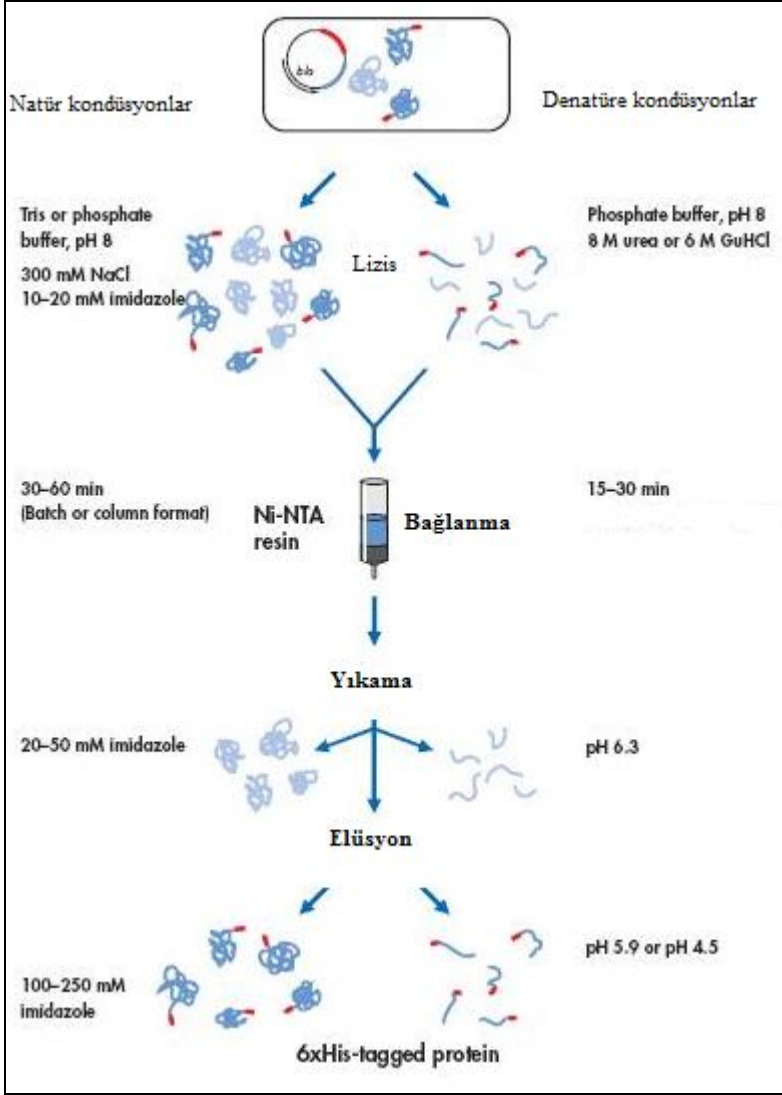
Klonlama aşamalarında kullanılan plazmid (vektör) pQE-30, Ampisilin direnç geni ve "6xHis tag" denilen 6 tane Histidin amino asitinden oluşmuş bir yapı içerir. Bu yapı klonlanmak istenilen genin başında bulunur ve genin ekspresyonu sırasında 6xHis tag yapı da eksprese olur.

Protein purifikasyonunda kullanılan Ni-NTA agaroz (resin), kromatografik bir matriks oluşturur ve içerdiği Nikel atomları ile 6xHis tag yapı etkileşime girer. 6xHis tag yapı, protein purifikasyonu sırasında istenilen proteinin elde edilmesini sağlar. Ayrıca pQE-30'un içerdiği *lac* operonları ile protein ekspresyonunun kontrolünü gerçekleştirir.



Şekil 2.5: Rekombinant pQE-30 ile pREP4 plazmidin IPTG ile uyarılmasını gösteren şema (83)

Konak hücre olarak kullanılan E. Coli M15 hücresi, E. Coli K12 derivatıdır ve protein ekspresyonunun kontrolünün sağlanması için pREP4 plazmidini içerir. pREP4 represör plazmid, pQE-30'da bulunan *lac* operonlarını baskılar ve transkripsiyonu inhibe eder. Protein ekspresyonunu indüklemek için ortama verilen IPTG ile *lac* operonları üzerinden bu baskı kalkmış olur ve protein ekspresyonu gerçekleştirilir (Şekil 2.5). Protein purifikasyonu Ni-NTA resin matriksi kullanılarak afinite kromatografisi yöntemi ile denatüre edici koşullarda gerçekleştirilir (83). (Şekil 2.6).

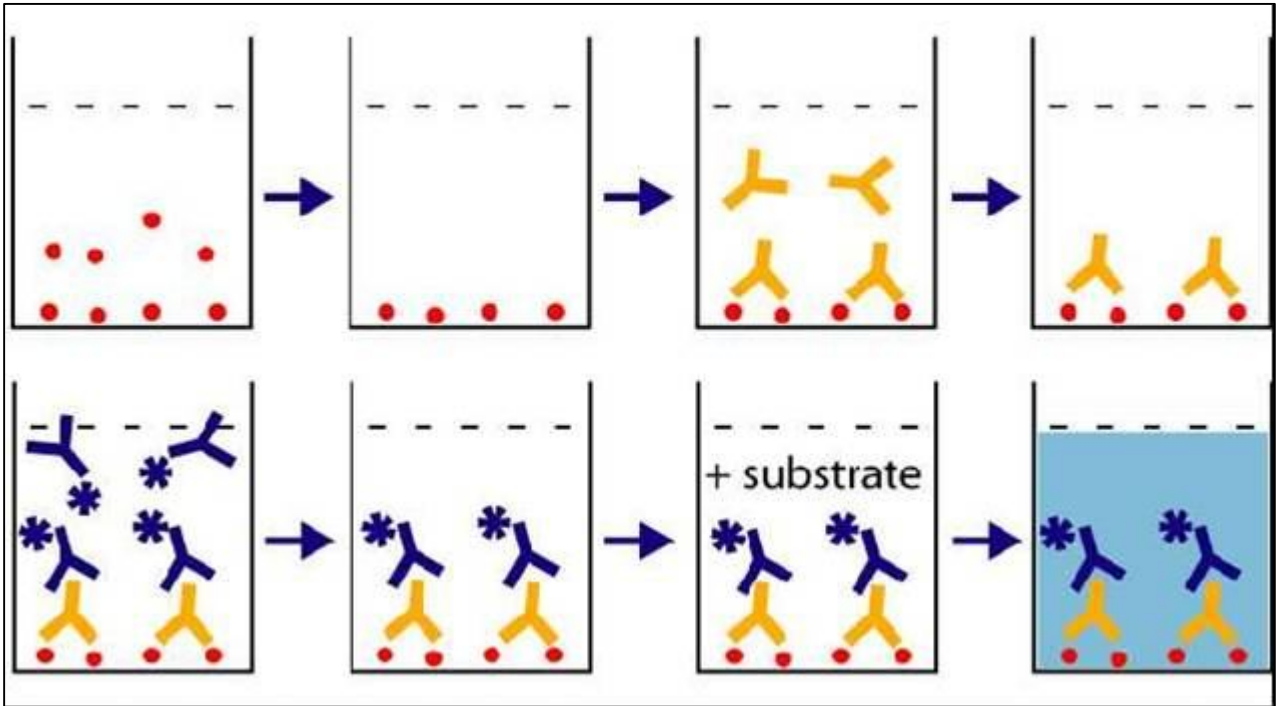


Şekil 2.6: 6xHis tag proteinlerin doğal ve denatüre edici koşullardaki purifikasyon basamakları (83).

2.5. ELISA:

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), serum örneğinde bilinmeyen miktardaki bir antijen veya antikor varlığını tespit etmek için genel olarak immunolojide kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. Belirli miktardaki antijen katı bir yüzeye (genellikle polistiren mikrotitre tabak) fikse edilir ve serum örneğinde söz konusu antijene spesifik antikor miktarını tespit etmek için serum örneği eklenir ve bu şekilde antijen-antikor kompleksi meydana gelmiş olur. Oluşan kompleksi tespit etmek için enzim bağlı ikincil antikor eklenir. İkincil antikora konjuge enzim için genel olarak Alkalen fosfataz ya da Horse radish peroksidaz enzimleri kullanılır. Her aşama arasında spesifik olarak bağlanmayan antijen ya da antikoru temizlemek için hafif bir deterjan solüsyonu ile tabak yıkanır. Son yıkama aşamasının ardından enzimatik bir

substrat eklenerek tespit edilebilen bir sinyal oluşması sağlanır, bu da örnekteki antikor miktarını gösterir (Şekil 2.7). Eski ELISA deneylerinde renkli bir bileşik oluşturan kromojenik substratlar kullanılırken yeni deneylerde daha hassas ölçümler için floresan ışığa reaksiyonuna sebep olan florojenik substratlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada klonlanarak proteinleri elde edilen PINK1 ve SWAP70 antijenlerini tabaklara kaplayarak Behçet hasta ve normal serumlardaki antikor miktarını tespit etmek için ELISA deneyleri gerçekleştirildi. ELISA deneylerinde florojenik substrat kullanıldı.



Şekil 2.7: ELISA yönteminin basamaklarını gösteren şematik resim.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Örnekleri:

Çalışmamız için, 2007- 2008 yılları arasında İ.Ü. İTF İç Hastalıkları AD, Romatoloji Bilim Dalında Behçet hastalığı tanısı ile izlenen ve tedavi edilen hastaların (n=100; aktif dönemdeki), rutin kan analizleri sırasında alınmış olan serum örnekleri toplanmıştır. Hasta serumları ayrıldıktan sonra, -80°C de çalışma için saklanmaktadır.

Behçet hastalarına ait serumlar aşağıdaki baskın klinik bulguları göstermektedir:

- 1- Deri tutulumu/mukoza tutulumu/eritema nodozum varlığı
- 2- Üveit varlığı
- 3- Eklem tutulumu/akut artrit bulgusu
- 4- Vasküler tutulum/derin ven trombozu (DVT) bulgusu

Çalışmamızda yer alan kontrol grubu, 2007- 2008 yılları arasında toplanmış sağlıklı kişilere ait (n=100) serum örneklerinden oluşmaktadır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar:

PZR cihazı	Techne
Elektroforez aleti	Thermo
Elektroforez için güç kaynağı	EC-105
Kameralı görüntüleme sistemi	Biorad
Hibridizasyon fırını	Techne
Heat block	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Kerman
Çalkalamalı inkübatör	Thermo
+4 $^{\circ}\text{C}$ buzdolabı	Sanyo Labcool
-20 $^{\circ}\text{C}$ buzdolabı	Bosch
-80 $^{\circ}\text{C}$ buzdolabı	Hettich
Etüv	Memmert
Otoklav	Tuttnauer
Distile su cihazı	Millipore

ELISA yıkayıcısı	Biorad
ELISA okuyucu	Biorad
Nano Drop spektrofotometre	Thermo
Peristaltik pompa	Ismatech

3.1.3. Kimyasallar:

Substrat (AttoPhos AP Fluorescent)	Promega
2.cil antikor (goat α –human IgG AP-conjugated)	Southern Biotech
Agaroz	Sigma
Ni-NTA agaroz	Qiagen
Agar	Appllichem
Ampisilin	Roche
Kanamisin	Sigma
PBS (Steril)	Biochrome AG
PBS (Tablet)	Ambresco
Tween 20	Sigma
Süttozu	Pınar
NaOH	Merck
MgSO ₄	Sigma
KCl	Sigma
RbCl	Appllichem
MnCl ₂	Sigma
Potasyum asetat	Appllichem
CaCl ₂	Appllichem
Gliserol	Sigma
MOPS	Appllichem
Tripton	Becton Dickenson
NaCl	Appllichem
Yeast extract	Becton Dickenson
IPTG	Fermentas
Gu-HCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
Tris-Cl	Sigma

Urea Merck

3.1.4. PZR, Enzim Kesimi Malzemeleri ve Kitler:

PINK1 F primer	İontek
PINK1 R primer	İontek
SWAP70 F primer	İontek
SWAP70 R primer	İontek
Long Template PCR Kit	Roche
HindIII	Fermentas
BamHI	Fermentas
Sall	Fermentas
Jel ekstraksiyon purifikasyon kiti	Qiagen
QIAexpress Type IV Kit	Qiagen
T4 DNA Ligaz	Takara
MiniPrep Kit	Qiagen
Ni-NTA filtreli column	Qiagen
PINK1 sentetik peptid (484-504)	Abcam

3.1.5. Gerekli Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması:

LB Sıvı Besiyeri: 10 gr NaCl, 10 gr tripton ve 5 gr yeast extract tartılır, dH₂O ile 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlanır. +4 °C’de saklanır.

LB Agar: 10 gr NaCl, 10 gr tripton, 5 gr yeast extract ve 15 gr agar tartılarak dH₂O ile 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlanır. 55 °C’ye kadar soğutulduktan sonra hemen kullanılır.

Psi Broth: LB sıvı besiyeri içinde 4 mM MgSO₄ ve 10 mM KCl olacak şekilde hazırlanır ve 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir. +4 °C’de saklanır.

Kanamisin Stok Solüsyonu: 25 mg/ml olacak şekilde tartılır ve dH₂O içinde çözülür. 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra alikotlar şeklinde -20 °C’de saklanır.

Ampisilin Stok Solüsyonu: 100 mg/ml olacak şekilde tartılır ve dH₂O içinde çözülür. 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra alikotlar şeklinde -20 °C’de saklanır.

Kanamisinli LB Agar: LB agar 1 litre olacak şekilde hazırlanıp 55 °C’ye kadar soğutulduktan sonra kanamisin stok solüsyonundan 1 ml eklenir ve petrilere dökülür.

Ampisilin ve Kanamisinli LB Agar: LB agar 1 litre olacak şekilde hazırlanıp 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra kanamisin stok solüsyonundan 1 ml ve ampisilin stok solüsyonundan 1 ml eklenir ve petrilere dökülür.

Gliserol Stok Solüsyonu: %50 LB sıvı besiyeri ve %50 Gliserol karıştırılır. 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir.

IPTG (1 M): 238 mg/ml olacak şekilde tartılır ve dH₂O içinde çözündürülür. 0,2 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra alikotlar şeklinde -20 °C'de saklanır.

TFB1 Buffer: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM potasyum asetat, 10 mM CaCl₂, %15 gliserol, pH 5.8 olacak şekilde ayarlanır, filtreden geçirilerek sterilize edilir.

TFB2 Buffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, %15 gliserol, pH 6.8 olacak şekilde KOH ile ayarlanır, filtreden geçirilerek sterilize edilir.

Buffer A: 6M Gu-HCl; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır ve pH 8,0'e ayarlanır.

Buffer B: 8M Urea; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır ve pH 8,0'e ayarlanır.

Buffer C: 8M Urea; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır ve pH 6,3'e ayarlanır.

Buffer D: 8M Urea; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır ve pH 5,9'a ayarlanır.

Buffer E: 8M Urea; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl olacak şekilde dH₂O ile hazırlanır ve pH 4,5'e ayarlanır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. SWAP70 ve PINK1 Genlerinin PZR Yöntemi ile Amplifikasyonu:

SWAP70 geni, karaciğer mRNA'sından sentezlenmiş cDNA kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi. Bunun için Expand Long Template PCR System (Roche) kullanıldı.

SWAP70 geni için gerekli olan primer çiftleri, 5' uçlarına ilgili restriksiyon bölgeleri eklenerek dizayn edildi:

Forward Primer:

5' TTTATTGGATCCATGGGGAGCTTGAAGGAGGAGCTG 3'

Reverse Primer:

5' TTTATTGTCGACTCACTCCGTGGTCTTTTCTCTTTCC 3'

PZR Kondüsyonları:

dNTP (10 mM):	1.75 ul
Forward Primer (12.5 uM):	1.2 ul
Reverse Primer (12.5 uM):	1.2 ul
10X Buffer:	5 ul
Long Taq polimeraz:	1 ul
dH ₂ O:	37.85 ul
<u>cDNA:</u>	<u>2 ul</u>
Toplam hacim:	50 ul

Isı kondüsyonları, başlangıç denatürasyonu 2 dk 92 °C, 35 döngü boyunca 15 sn 92 °C, 30 sn 65 °C, 4 dk 68 °C, final ekstensiyon 7 dk 68 °C olacak şekildedir.

PINK1 geni, beyin mRNA'sından sentezlenmiş cDNA kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi. PINK1 geni için dizayn edilen primer çiftleri, PINK1 geni C-terminal bölgesindeki bölgeyi amplifiye edecek şekildedir:

Forward Primer:

5' TTTATTGGATCCGCCTATGAAATCTTCGGG 3'

Reverse Primer:

5' TTTATTAAGCTTTCACAGGGCTGCCCTCCATGAG 3'

PZR Kondüsyonları:

dNTP (2 mM):	2.5 ul
MgCl (25 mM):	2 ul
Forward Primer:	1.4 ul
Reverse Primer:	1.4 ul
10X KCl Buffer:	2.5 ul
Taq polimeraz (5 u/ul):	0.3 ul
dH ₂ O:	13.9 ul
<u>cDNA:</u>	<u>1 ul</u>
Toplam hacim:	25 ul

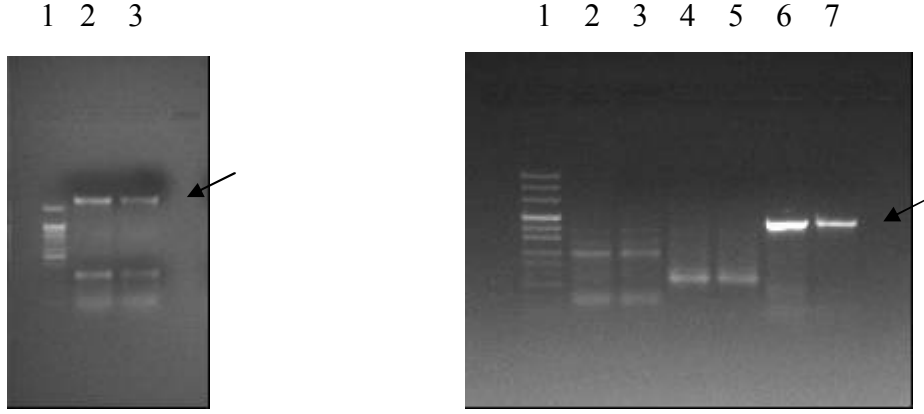
Isı kondüsyonları, başlangıç denatürasyonu 2 dk 95 °C, 35 döngü boyunca 45 sn 94 °C, 45 sn 56 °C, 1 dk 72 °C, final ekstensiyon 10 dk 72 °C olacak şekildedir.

PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edildi.

3.2.2. Agaroz Jel Elektrofrez:

PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektrofrez ile görüntüledi.

Beklenen bant boyları SWAP70 için 1758 bp, PINK1 için 420 bp'dir.



Şekil 3.1: PZR ürünlerinin agaroz jel elektrofrez. Soldaki resim SWAP70'e ait agaroz jel görüntüsüdür; 1: Marker, 2-3: SWAP70 (Ok ile belirtilmiştir). Sağdaki resim PINK1'e ait agaroz jel görüntüsüdür; 1: Marker, 6-7: PINK1 (Ok ile belirtilmiştir); (Diğer kuyularda deneme PZR ürünleri bulunmaktadır).

Agaroz Jelin Hazırlanması: %1'lik jel hazırlamak için 0.5 gr agaroz tartılarak 50 ml 1X TAE solüsyonu içinde çözdürüldü ve mikrodalga fırında homojenize olana dek kaynatıldı. Jelin donmamasına dikkat edilerek bir süre soğutulduktan sonra çeker ocak altında 10 mg/ml oranında hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1 ul eklendi. Sıvı haldeki agaroz, elektrofrez tepsisine döküldü ve taraklar yerleştirildikten sonra jelin donması beklendi. Tepsi, hazırlanmış agaroz jel ile birlikte, 1X TAE solüsyonu içeren elektrofrez tankına yerleştirildi.

Jelin Yüklenmesi-Elektrofrez-Görüntüleme: PZR ürünlerinin jel kuyucuklarına çökmesini sağlamak amacı ile 6X brom fenol mavisi içeren loading buffer solüsyonundan 2'şer ul, 10 ul PZR ürünleri ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Uygun size marker'ın yüklenmesini takiben tankın elektrodları bağlandı ve 80-90 V altında örnekler yaklaşık 20 dk yürütüldü. İşlem sonrasında jel U.V. ışık altında CCD kamera ile görüntülenerek bilgisayara kaydedildi. Ayrıca printer çıktıları alındı.

3.2.3. PZR Ürününün Jelden Purifikasyonu:

Elektrofrez işlemi bittikten sonra jel üzerindeki PZR bandı U.V. ışık altında temiz bir bistüri ile kesilerek jelden çıkartıldı. PZR ürününü içeren jel parçası Gel Extraction Kit (Qiagen) ile purifiye edildi.

Kitin Protokolü:

- 1- PZR bandını içeren jel parçası temiz bir bistüri ile kesilip çıkartılarak ependorf tüpüne konuldu.
- 2- Jel parçasının elektronik tartıda ağırlığı ölçüldü. Jelin 1 hacmine 3 hacim olacak şekilde Buffer QG denilen ve jelin çözünmesini sağlayan solüsyondan eklendi. (Örneğin, 100 mg jel parçasının üzerine 300 ul Buffer QG eklenir.)
- 3- Jel parçası tamamen çözünene dek 50 °C'de 10 dk bekletildi. Çözünmesine yardım etmek için inkübasyon süresince her 2-3 dk'da bir tüp vortekslendi.
- 4- Jel parçası çözüldükten sonra jelin ilk hacmi kadar İzopropanol eklendi. (Örneğin, jel parçası 100 mg ise 100 ul İzopropanol eklendi.)
- 5- Kit içerisindeki spin column denilen filtreli tüpler, 2 ml'lik collection tüp denilen toplama tüplerine yerleştirildi.
- 6- DNA'yı bağlayabilmek için karışım spin column üzerine konuldu ve 1 dk santrifüj edildi.
- 7- Collection tüpte toplanan kısım atıldı ve içine aynı spin column yerleştirildi.
- 8- Yıkamak için etanol içeren Buffer PE'den 0.5 ml eklendi ve 1 dk santrifüj edildi.
- 9- Filtreden geçen kısım atıldı ve Buffer PE'den arınması için spin column boş olarak 1 dk daha santrifüj edildi.
- 10- Spin column temiz bir ependorfa alındı.
- 11- DNA'yı elde edebilmek için Buffer EB denilen elüsyon solüsyonundan 30 ul eklendi, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve sonra 1 dk santrifüj edildi.

3.2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Yapışkan Uçların Oluşturulması:

PZR ürünleri jelden purifiye edildikten sonra NanoDrop cihazında O.D'leri ölçüldü. Enzim kesimi reaksiyonuna toplam hacimde en az 100 ng olacak şekilde PZR ürününden konuldu. PZR ürünü hangi restriksiyon enzimleriyle kesiliyorsa aynı enzimlerle vektör (pQE-30) de kesildi.

SWAP70 Restriksiyon Enzim Kesimi:

	SWAP70 (O.D = 15.2 ng/ul)	Plazmid (pQE-30, 100 ng/ul)
	7 ul	2 ul
BamHI:	1 ul	1 ul
Sall:	2 ul	2 ul
10X BamHI Buffer:	2 ul	2 ul
<u>dH2O:</u>	<u>8</u>	<u>13 ul</u>
Toplam hacim:	20 ul	20 ul

37 °C’de gece boyu inkübe edildi.

PINK1 Restriksiyon Enzim Kesimi:

	PINK1 (O.D = 11 ng/ul)	Plazmid (pQE-30, 100 ng/ul)
	10 ul	2 ul
BamHI:	1 ul	1 ul
HindIII:	2 ul	2 ul
10X BamHI Buffer:	2 ul	2 ul
dH2O:	5 ul	13 ul
Toplam hacim:	20 ul	20 ul

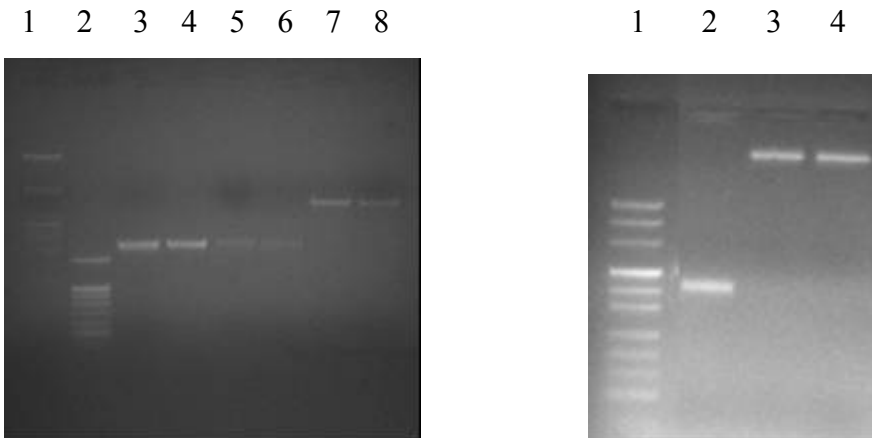
37 °C’de gece boyu inkübe edildi.

3.2.5. Plazmid Enzim Kesiminin Defosforilasyonu:

Ertesi gün plazmid enzim kesimlerine Calf Intestine Alkaline Fosfatase (CIP) enziminden eklendi. Bu işlemin amacı vektör, restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra plazmid DNA’sının uçlarında bulunan fosfat gruplarını uzaklaştırmak ve böylece klonlanacak gen bölgesi (insert) ile uygun bir şekilde birleşmesine yardımcı olmaktır. Klonlanacak gen bölgesinin (insert) enzim kesimine CIP eklenmez.

Restriksiyon enzim kesimi toplam hacmi dikkate alınarak CIP’ den 1 ul ve 10X CIP Buffer’ dan 2 ul olacak şekilde eklendikten sonra 37 °C’de 30 dk inkübe edilir.

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi:



Şekil 3.2: Restriksiyon enzim kesimlerine ait agaroz jel elektroforezi. Soldaki SWAP70 enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü; 1: Marker, 2: Marker, 3-6: SWAP70, 7-8: pQE-30. Sağdaki PINK1 enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü; 1: Marker, 2: PINK1, 3-4: pQE-30.

%1'lik agaroz jel daha önceden anlatıldığı gibi hazırlandı ve enzim kesim ürünleri inkübasyondan sonra jele yüklenerek U.V. ışık altında CCD kamera ile görüntülendi.

3.2.7. Enzim Kesim Ürünlerinin Jelden Purifikasyonu:

Enzim kesim ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra daha önceden anlatıldığı gibi bantlar bistüri yardımıyla kesilerek Gel Extraction Kit (Qiagen) ile purifiye edildi.

Purifiye edilmiş enzim kesim ürünlerinin NanoDrop cihazında O.D'leri ölçüldü:

SWAP70 O.D = 3.7 ng/ul

PINK1 O.D = 5 ng/ul

3.2.8. Ligasyon:

Insert ve plazmid DNA'larını birleştirmek amacıyla T4 DNA Ligaz enziminin katalizlediği reaksiyona ligasyon denir. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak ligasyon yapıldı.

Plazmid miktarı (ng/ul) = Insert miktarı (ng/ul)

Plazmid uzunluğu (bp) Insert uzunluğu (bp)

Bu eşitlik yardımıyla gerekli insert miktarı bulunduktan sonra yapışkan uçlar için gerekli olan Plazmid: Insert oranı 1:3 olacak şekilde reaksiyona konuldu.

SWAP70 ve pQE-30 Ligasyonu:

SWAP70 O.D = 3.7 ng/ul ve pQE-30 O.D = 13.6 ng/ul olarak ölçüldükten sonra plazmid, reaksiyon toplam hacminde en az 25 ng olacak şekilde konuldu.

$$\frac{25 \text{ ng}}{3400 \text{ bp}} = \frac{X}{1758 \text{ bp}}$$

$$X = 12.5 \text{ ng}$$

$$1:3 \text{ oranı ile } 12.5 \text{ ng} \times 3 = 37.5 \text{ ng}$$

$$1:3 \text{ oranı ile } 12.5 \text{ ng} \times 3 = 37.5 \text{ ng}$$

pQE-30 (Toplam hacimde 25 ng) :	7 ul
SWAP70 (Toplam hacimde 37.5 ng):	3 ul
T4 DNA Ligaz:	1 ul
10X Ligaz Buffer:	2 ul
<u>dH2O:</u>	<u>7 ul</u>
Toplam hacim:	20 ul

PINK1 ve pQE-30 Ligasyonu:

PINK1 O.D = 5 ng/ul ve pQE-30 O.D = 1.6 ng/ul olarak ölçüldükten sonra plazmid reaksiyon toplam hacminde en az 25 ng olacak şekilde konuldu.

$$\frac{25 \text{ ng}}{3400 \text{ bp}} = \frac{X}{420 \text{ bp}}$$

$$X = 3 \text{ ng/ul};$$

$$1:3 \text{ oranı ile } 3 \times 3 = 9 \text{ ng}$$

PINK1 (Toplam hacimde 9 ng):	2 ul
pQE-30 (Toplam hacimde 25 ng):	6.5 ul
T4 DNA Ligaz:	1 ul
10X Ligaz Buffer:	2 ul
<u>dH2O:</u>	<u>7.5 ul</u>
Toplam hacim:	20 ul

Ligasyon tüpleri 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi (62).

3.2.9. Kompetan Hücrenin Hazırlanması:

- 1- Qiagen M15(pREP4) hücrelerinden öze ile alınarak 25 ug/ml Kanamisin içeren LB agar petriye yayılır.
- 2- Gece boyu 37 °C etüvde inkübe edilir.
- 3- Tek bir koloni alınarak 25 ug/ml Kanamisin içeren 10 ml'lik LB medium içine koyulur ve 37 C çalkalamalı inkübatörde gece boyu büyütülür.
- 4- Bu kültürden 1 ml alınır ve 25 ug/ml Kanamisin içeren 100 ml'lik LB medium içine koyulur ve 37 °C çalkalamalı inkübatörde OD 600'de 0,5 olana kadar (yaklaşık 2-3 saat) inkübe edilir.
- 5- Kültür buzda 5 dk soğutulur.
- 6- 4 °C'de 4000 x g'de 5 dk santrifüj edilerek hücreler elde edilir.
- 7- Supernatan atılır ve hücreler her zaman buzda tutulur.
- 8- Hücrelerin üzerine 30 ml soğuk TFB1 Buffer eklenerek hücreler süspansiyon edilir ve bu süspansiyon buzda 90 dk tutulur.

- 9- 4 °C'de 4000 x g'de 5 dk santrifüj edilerek hücreler elde edilir.
- 10- Supernatan atılır ve hücreler her zaman buzda tutulur.
- 11- Hücreler 4 ml soğuk TFB2 Buffer içinde süspanse edilir.
- 12- 100-200 ul'lik alikotlar alınarak steril ependorflara koyulur ve -80 °C'de saklanır.

3.2.10. Transformasyon:

- 1- Ligasyon karışımından 10 ul ya da daha az alikotlar alınır ve soğutulmuş transformasyon tüplerine konulur. Buzda bekletilir.
- 2- - 80 °C'de donmuş kompetan Qiagen M15(pREP4) hücrelerinden bir alikotun buzda çözünmesi sağlanır.
- 3- Hücreler süspanse edilir ve 100 ul alınarak ligasyon karışımına eklenir, dikkatlice karıştırılır, buzda 20 dk bekletilir.
- 4- Tüpler 42 °C sıcak su banyosunda 90 saniye tutulur.
- 5- Sonra üzerlerine 500 ul Psi Broth eklenir ve 37 °C çalkalamalı inkübatörde 60-90 dakika inkübe edilir.
- 6- Bu karışımdan 50, 100 ve 200 ul'lik alikotlar alınarak 25 ug/ml Kanamisin ve 100 ug/ml Ampisilin içeren LB agar petrilere cam baget ile yayılır. Besiyerleri 37 °C etüvde gece boyu inkübe edilir.

Pozitif Kontrol (Transformasyonun etkinliği için): Qiagen pQE-40 kontrol plazmidinden 1 ng alınarak 20 ul T.E içinde hücreler transforme edilir. Bu transformasyon karışımı ve 1:10 'luk dilüsyonu 25 ug/ml Kanamisin ve 100 ug/ml Ampisilin içeren LB agara cam baget ile yayılır. Transformasyonun etkinliği için pozitif kontrol petrisinde mutlaka üremenin olması beklenir.

Negatif Kontrol (Antibiyotik aktivitesinin kontrolü için): Hücreler 20 ul T.E ile transforme edilir ve bu karışımdan en az 200 ul alınarak 25 ug/ml Kanamisin ve 100 ug/ml Ampisilin içeren LB agar petriye cam baget ile yayılır. Antibiyotik aktivitesinin kontrolü için negatif kontrol petrisinde asla üremenin olması beklenmez.

3.2.11. Plazmid İzolasyonu:

Transformasyon sonucu üreme gözlenen petrilere tek bir koloni alınarak 25 ug/ml Kanamisin ve 100 ug/ml Ampisilin içeren 1-5 ml'lik LB besiyerine konulur ve gece boyu 37 °C çalkalamalı inkübatörde inkübe edilir. Kültürden 700 ul alınarak %50 LB ve %50 gliserol karışımından 300 ul ile karıştırılır. Bu şekilde gliserol stokları oluşturularak -80 °C'de saklanır. Kültürün geri kalanı

(en az 1 ml) 5400 x g'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatant dökülür ve hücreler elde edilir. Bu hücrelerden Qiagen MiniPrep Kit ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilir:

- 1- Bakteri hücre pelletini lizis etmek için kit içindeki Buffer P1 solüsyonu kullanılır. Buffer P1'e yine kit içindeki RNase A eklenir. Ayrıca hücrelerinin tümünün lizis olduğundan emin olmak için mavi renk veren LyseBlue Reagent'tan 1:1000 oranında Buffer P1'e eklenir. Bu şekilde hazırlanan Buffer P1 solüsyonundan pellete 250 ul eklenerek süspanse edilir.
- 2- Hücrelerinin lizisinin devamı için Buffer P2 solüsyonundan 250 ul eklenerek karıştırılır. Süspanسیونun rengi Buffer P2 eklendiğinde maviye döner. Bu, tüm hücrelerin lizis olduğunu gösterir. Karıştırma işleminin 5 dakikadan fazla sürmemesi gerekir.
- 3- İçeriğinde SDS bulunan Buffer N3'ten 350 ul eklenerek karıştırılır. Süspanسیونun rengi beyaza döner. Bu işlem hücresel artıkların presipitasyonunu sağlar.
- 4- Süspanسیون 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Hücresel artıklar pellet oluşturur.
- 5- Sopernatant, filtreli QIAprep spin column'a eklenir.
- 6- 30-60 sn santrifüj edildikten sonra filtreden çıkan kısım atılır.
- 7- QIAprep spin column'a Buffer PB'den 500 ul eklendikten sonra 30-60 sn santrifüj edilir. Filtreden çıkan kısım atılır. Bu işlem nükleazların aktivitesini uzaklaştırır.
- 8- QIAprep spin column'a %100 etanol içeren Buffer PE'den 750 ul eklenir. 30-60 sn santrifüj edildikten sonra çıkan kısım atılır.
- 9- Etanolden arındırmak için QIAprep spin column boş olarak 30-60 sn santrifüj edilir. Çıkan kısım atılır.
- 10- QIAprep spin column, temiz bir ependorfa alındıktan sonra üzerine, filtrenin tam ortasına gelecek şekilde Buffer EB denilen elüsyon solüsyonundan 50 ul eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika santrifüj edilir.

Plazmid DNA'ları protokole göre elde edildikten sonra NanoDrop cihazında O.D'leri ölçülür ve klonlamanın konfirmasyonu için restriksiyon enzim kesimi yapılır. Bu plazmidler klonlamadan önce hangi restriksiyon ezimleriyle kesimleri yapıldıysa, aynı restriksiyon enzimleriyle kesimleri gerçekleştirilir:

SWAP70 ile klonlanan Plazmid O.D: 250 ng/ul

Plazmid:	2 ul
BamHI:	1 ul
SallI:	1 ul
10X BamHI Buffer:	2 ul

dH₂O: 13 ul

Toplam: 20 ul

37 °C'de gece boyu inkübe edilir.

PINK1 ile klonlanan Plazmid O.D: 150 ng/ul

Plazmid: 5 ul

BamHI: 1 ul

HindIII: 2 ul

10X BamHI Buffer: 2 ul

dH₂O: 10 ul

Toplam: 20 ul

37 °C'de gece boyu inkübe edilir.

Enzim kesimleri daha önceden anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Plazmid DNA'ları konfirmasyon amacı ile dizilemeye gönderildi. (İontek Lab.)

3.2.12. Protein Purifikasyonu:

-80 °C'de saklanan daha önceden hazırlanmış gliserol stoklarından birer alikot alınır ve çözdürülür.

- 1- Gliserol stoğundan 5 ul alınarak 100 mg/ml Ampisilin ve 25 mg/ml Kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine eklenir. 37 °C'de 200 rpm'de çalkalanarak gece boyu inkübe edilir.
- 2- Büyüyen kültürün tamamı 100 mg/ml Ampisilin ve 25 mg/ml Kanamisin içeren 500 ml LB besiyerine eklenir. 37 °C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilir.
- 3- Kültürün belli zaman aralıklarında O.D'si 600 nm'de ölçülür.
- 4- O.D 600 nm'de 0,6 olunca 1M IPTG'den 500 ul eklenir. En az 4 saat olacak şekilde ya da gece boyu 37 °C'de 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilir
- 5- Kültür buzda soğutulduktan sonra 3500 rpm'de +4 °C'de 20 dk santrifüj edilir. Supernatant dökülerek hücreler elde edilir.
- 6- 500 ml'lik LB için 20 ml Buffer A'dan eklenir. Karıştırılarak pellet hücreleri lizis edilir.
- 7- Hücrelerin iyice lizis olduğundan emin olmak için süspansiyon homojenize hale gelene kadar 1 saat boyunca karıştırılır.
- 8- 10 000 rpm'de +4 °C'de 20 dk santrifüj edilir.
- 9- Supernatant temiz bir falkon tüpe alınır. Lizatın 10 hacmi için 1 hacim resin (Ni-NTA agaroz) eklenir ve 40 dk boyunca karıştırılır. (Örneğin, 20 ml lizat için 2 ml resin eklenir.)

- 10- 6xHis tag proteinlerin purifikasyonu için kullanılan Ni-NTA filtreli column dH₂O ile yıkanarak temizlenir ve ektensiyon tüplerinin yardımıyla peristaltik pompaya bağlanır.
- 11- Ni-NTA column üzerinden resin ve lizat karışımı pastör pipeti ile damlatılarak konur. Peristaltik pompanın akış hızı 0,4 ml/dk'ya ayarlanarak lizatın column'dan akışı sağlanır.
- 12- Çıkan kısım toplanarak tekrar column'dan geçirilir. İkinci geçişten sonra çıkan kısım atılır.
- 13- Ni-NTA column üzerine Buffer B'den 15 ml damlatılarak eklenir. Çıkan kısım atılır.
- 14- Ni-NTA column üzerine Buffer C'den 15 ml damlatılarak eklenir. Çıkan kısım atılır.
- 15- Ni-NTA column üzerine Buffer D'den 15 ml damlatılarak eklenir. Çıkan kısım atılır.
- 16- Ni-NTA column üzerine Buffer E'den 15 ml damlatılarak eklenmeye başlandığında çıkan kısım toplanır.
- 17- Protein içeren bu kısım toplanma sırasına göre ependorflara ayrılır ve NanoDrop cihazında 280 nm'de O.D'leri ölçülür. O.D'si en yüksek olanlar, protein içeriği en yüksek olanlardır.

3.2.13. Bradford Metodu Kullanılarak Protein Konsantrasyon Tayini:

Bradford Metodu, Commasie Brilliant Blue boyasının standart bir proteine (Bovine Serum Albumin, BSA) bağlanma özelliğinden yararlanılarak bilinmeyen proteinin miktarının bulunmasına dayanır.

Bunun için aşağıdaki protokole göre Bradford Assay Kit (Pierce) kullanıldı:

- 1- Bilinmeyen proteinin dilüsyon solüsyonu olan Buffer E kullanılarak BSA'nın standart dilüsyonları hazırlanır. (Tablo 3.1)
- 2- Standart dilüsyonların her birinden 3'er kopya olacak şekilde 30'ar ul alınır ve üzerlerine 1500 ul Commasie Brilliant Blue boyası eklenir.
- 3- Bilinmeyen proteinden de 3'er kopya olacak şekilde 30'ar ul alınır ve üzerlerine 1500 ul Commasie Brilliant Blue boyası eklenir.
- 4- Örneklerle Commasie Brilliant Blue boyası iyice karıştırıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- 5- 595 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede dH₂O ile blank alındıktan sonra standartlar ve bilinmeyen protein kopyalarının sırasıyla O.D'leri ölçülür ve ortalamaları alınır.
- 6- H standardı referans standart olduğundan H dilüsyonunun O.D'si, ölçülen diğer O.D'lerden çıkartılarak değerler düzeltilir.
- 7- Standartların O.D değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizilir ve bu grafikten yararlanılarak bilinmeyen proteinin konsantrasyonu hesaplanır (13).

Tablo 3.1: Bradford standart dilüsyon hazırlanması.

Dilüsyon	Dilüsyon Solüsyonu Hacmi	BSA Kaynağı ve Hacmi	Final BSA Konsantrasyonu
A	0 ul	Stoktan 300 ul	2000 ug/ml
B	125 ul	Stoktan 375 ul	1500 ug/ml
C	325 ul	Stoktan 325 ul	1000 ug/ml
D	175 ul	B dilüsyonundan 175 ul	750 ug/ml
E	325 ul	C dilüsyonundan 325 ul	500 ug/ml
F	325 ul	E dilüsyonundan 325 ul	250 ug/ml
G	325 ul	F dilüsyonundan 325 ul	125 ug/ml
H	400 ul	0	0 ug/ml = Kör

3.2.14. Gümüş Boyama Yöntemi ile SDS-PAGE (SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi):

Proteinler purifiye halde elde edilip konsantrasyonları belirlendikten sonra poliakrilamid jele yüklenerek SDS-PAGE yöntemi ile büyüklüklerine göre ayrılır. Proteinlerin görüntülenebilmesi için poliakrilamid jel, gümüş boyama yöntemi ile boyanır.

Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve SDS-PAGE

Poliakrilamid jel iki kısımdan oluşur: Seperating jel ve Stacking jel.

Seperating Jel (%10'luk)

dH ₂ O	2,4 ml
1,5 M Tris (pH: 8,8)	1,3 ml
%10 SDS	0,05 ml
%40 Akrilamiks*	1,3 ml
%10 APS	0,05-0,1 ml
TEMED	0,002-0,01 ml

* %40 Akrilamiks: 81 ml %4 bisakrilamid ve 169 ml %60 akrilamid olacak şekilde hazırlanır.

Poliakrilamid jel için gerekli olan camlar, parlak yüzeyleri birbirine bakacak şekilde kısıkaçlar yardımıyla birleştirilir. Seperating jelden 1 ml alınarak camların dibine konulur ve poliakrilamid

jel için tıkaç görevi görür. Camların altındaki jel donduktan sonra camların arasında kalan boşluğa seperating jelin tamamı eklenir. Bu jel polimerize olup donduktan sonra stacking jel hazırlanır.

Stacking Jel:

dH ₂ O	0,72 ml
%40 Akrilamiks	0,13 ml
1 M Tris (pH: 6,8)	0,13 ml
%10 SDS	0,01 ml
%10 APS	0,01 ml
TEMED	0,001 ml

Stacking jel karışımı, seperating jelin üzerine eklenir. Camların arasına tarak yerleştirilir ve jelin polimerize olarak donması beklenir.

Protein örnekleri, yükleme solüsyonu olan 2X Loading Buffer ile birebir oranında karıştırılır ve 98 °C'de 5 dk inkübe edilir.

Jeller donduktan sonra tarak çıkarılır. Camlar dikey elektroforez tankına yerleştirilir. Tankın içine elektrik iletimini sağlaması için elektroforez solüsyonu olan Running Buffer* eklenir.

*Running Buffer: 145 gr Glisin, 30 gr Tris-base ve 50 ml %10 SDS.

Kuyuların içi running buffer ile yıkanarak temizlendikten sonra protein örnekleri yüklenir. Tank voltaj kaynağına bağlanır ve 25-30 miliamper'de yaklaşık 30 dk yürütülür.

Poliakrilamid Jelin Gümüş Boyama Metodu ile Boyanması

Gerekli Solüsyonlar:

A Solüsyonu (10X Stok): 15 ml Asetik Asit, 285 ml Etanol

B Solüsyonu (10X Stok): 3 gr gümüş nitrat tartılıp 300 ml dH₂O'da çözündürülür.

C Solüsyonu: 4,5 gr NaOH, 0,03 gr Borax tartılıp 300 ml dH₂O'da çözündürülür ve 1,2 ml Formaldehid eklenir.

D Solüsyonu: 22,5 gr NaCO₃ tartılıp 300 ml dH₂O'da çözündürülür.

Poliakrilamid jel, yıkama kabına alınır ve A solüsyonundan 100 ml eklenir. 6 dk çalkalanarak inkübe edilir. Bu solüsyon dökülür ve 100 ml B solüsyonu eklenir. 15 dk çalkalanarak inkübe edilir. B solüsyonu da döküldükten sonra dH₂O ile 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde yıkanır. Sonra C solüsyonundan 100 ml eklenir ve görüntü oluşuncaya kadar çalkalanarak bekletilir. Görüntü oluşuktan sonra C solüsyonu dökülür ve D solüsyonundan 100 ml eklenir. 5 dk çalkalanarak bekletilir (13).

3.2.15. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Kuyu başına konması gereken antijen miktarı: 1 µg/ml

Total protein/antijenin içinde bulunması gereken toplam buffer (PBS) miktarının hesaplanması:

plate x 2 x 96 kuyu/plate x 25 µl/kuyu = µl = ml

Örnek:

8 antijen + 1 coat = 9 plate = tabak

9 plate x 2 x 96 kuyu/plate x 25 µl/kuyu = 43.200 µl = 4.3 ml PBS

Kuyu başına konması gereken antijen miktarı (1 µg/ml) hesaplanması:

1µg/ml x Y ml x 1 ml/ X mg =µl antijen + 4,3 ml PBS

X: antijen miktarı

Y: total buffer (PBS) miktarı

Örnek:

Antijen miktarı: 3 mg/ml

Total volume: 4,3 ml

1µg/ml x 5.5 ml x 1 ml/ 3 mg = 1.83 µl antijen

1. GÜN

Plate' lerin hazırlanması

1. Antijenler kuyu başına 1µg/ml olacak şekilde 4,3 ml PBS içinde çözülür (15 ml lik falkon içinde). 25 µl/ kuyu olacak şekilde plate lere aktarılır.
2. Gece boyu +4 °C de inkübe edilir.

2.GÜN

Serum ile inkübasyon

3. Plate' lerin içeriği dökülür.
4. 2 kere PBS+tween (%0.1) ile yıkanır.
5. 1 kere PBS ile yıkanır.
6. Her bir kuyuyu 30 ul/kuyu olmak üzere %5 lik süt tozu bulunan PBS ile bloke edilir.
7. En az 2-3 saat oda ısısında bekletilir.
8. Bloke edici buffer dökülür.
9. 1 kere PBS ile yıkanır.
10. Bloke edici buffer içindeki serum dilusyonlarını hazırlanır. (1:100 ve 1:400)
11. Plate' ler 1 kere PBS-T (Tween 20: %0.1) ile yıkanır.
12. İçeriği dökülür.
13. Serum dilusyonlarını 30 µl /kuyu olacak şekilde eklenir.

14. Gece boyu +4 °C de bekletilir.

3.GÜN

İkincil antikor ve Okuma

15. PBS+T ile 2 kez yıkanır.

16. 1 kere PBS ile yıkanır.

17. 30 µl/kuyu ikincil antikor (goat a-human IgG-AP conjugated) eklenir. 1:2000 dilusyonda blocking buffer'da dilue edilir.

örnek: 96 kuyu x9 plate x30µl/kuyu=yaklaşık 26 ml/2000=13 µl 2.cil antikor

18. 2 saat oda ısında bekletilir.

19. 2 kere PBS-T ile yıkanır.

20. 1 kere PBS ile yıkanır.

21. 30 µl/kuyu substrat eklenir.

22. Oda ısında 45 dakika karanlıkta bekletilir.

23. Renk gelişimini 15 µl stop solüsyonu (3N NaOH) ile durdurulur.

24. ELISA reader cihazında, eksitasyon 450/50, emisyon 580/50 ve gain 25 olacak şekilde okunur.

3.2.16. İstatistik Yöntemler:

ELISA sonuçları Graph Pad ve SPSS 13.0 programları kullanılarak Fischer kesinlik testi ve t-test analizleri yapılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanması:

Bu çalışmada ilk aşamada PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanması amaçlandı. Bu doğrultuda her iki gen, açık okuma çerçeveleri (ORF) göz önünde bulundurularak tam uzunlukta (full length olarak) PZR yöntemiyle amplifikasyonu denendi. Amplifikasyonda kullanılan primer dizilerinin 5' uçlarına eklenen restriksiyon dizileri ile ORF bütünlüğü korunarak SWAP70 geninin amplifikasyonu ve restriksiyon enzim kesimi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4.1).

```

5' ATG GGGAGCTTGAAGGAGGAGCTGCTCAAAGCCATCTGGCAGGCCTTCACCGCACTCGAC
CAGGACCACAGCGGCAAGGTCTCCAAGTCCCAGCTCAAGGTCCTTTCCCATAACCTGTGCAC
GGTGTGTAAGGTTCCCTCATGACCCAGTTGCCCTTGAAGAGCACTTCAGGGATGATGATGAGG
GTCCAGTGTCCAACCAGGGCTACATGCCTTATTTAAACAGGTTCAATTTGGAAAAGGTCCAA
GACAACCTTTGACAAGATTGAATTC AATAGGATGTGTTGGACCCCTCTGTGTCAAAAAAACCT
CACAAAGAATCCCTGCTCATTACAGAAGAAGATGCATTTAAAATATGGGTTATTTCAACT
TTTTATCTGAGGACAAGTATCCATTAATTATTGTGTGAGAAGAGATTGAATACCTGCTTAAG
AAGCTTACAGAAGCTATGGGAGGAGGTTGGCAGCAAGAACAATTTGAACATTATAAAATCAA
CTTTGATGACAGTAAAAATGGCCCTTCTGCATGGAACTTATTGAGCTTATTGGAAATGGAC
AGTTTAGCAAAGGCATGGACCAGGCTGTGTCTATGGCAATTAATGAAGTCTTTAARTGAA
CTTATATTAGATGTGTTAAAGCAGGTTACATGATGAAAAAGGGCCACAGACGGAAAACTG
GACTGAAAGATGTTTGTACTAAAACCCAACATAATTTCTTACTATGTGAGTGAGGATCTGA
AGGATAAGAAAGGAGACATTCTCTGGATGAAAAATGCTGTGTAGAGTCCCTGCCTGACAAA
GATGGAAAGAAATGCCTTTTTCTCGTAAAAATGTTTGTATAAGACTTTTGAAATCAGTGCTTC
AGATAAGAAGAAGAAACAGGAGTGGATTCAAGCCATTCACTTACTATTATCTGTTGAAGC
TGGGCAGCCCTCCACCACACAAAGAAGCCCGCCAGCGTTCGAAAGAAGTCCGGAAGAAGCAG
CTGGCTGAACAAGAGAACTGGAGCGACAAATGAAGGAACTCAGGCCGCCAACGAAAGCAA
GCAGCAGGAGCTGGAGGCCGTGCGGAAGAACTGGAGGAAGCAGCATCTCGTGCAGCAGAAG
AGGAAAAGAAACGCCTTCAGACTCAAGTGGAACTTCAGGCCAGGTTTCAGCACAGAGCTGGAA
AGAGAGAAGCTTATCAGACAGCAGATGGAAAGACAGGTTGCTCAAAAGTCCCTCTGAACTGGA
ACAGTATTTACAGCGAGTACGGGAGCTGGAAGACATGTACCTAAAGCTGCAGGAGGCTCTTG
AAGATGAGAGACAGGCCCGCAAGATGAAGAGACAGTGCAGGAACTTCAGGCCAGGTTGTTG
GAGGAAGAGTCTTCCAAGAGGGCTGAACTAGAAAAGTGGCACTTGGAGCAGCAGCAGGCCAT
TCAGACAACCGAGGCCGAGAAGCAGGAGTTGGAGAATCAGCGTGTCTGAAGGAACAGGCC
TGCAGGAGGCCATGGAGCAGCTGGAGCAGCTTGTAGTTAGAACGGAAGCAAGCACTTGAGCAG
TACGAGGAAGTTAAAAAGAAGCTGGAGATGGCAACTAATAAGACCAAGAGCTGGAAGGACAA
AGTGGCCCATCATGAAGGATTAATTCGACTGATAGAACCAGGTTCAAAGAACCCTCACCTGA
TCACTAACTGGGACCTGCAGCTTTCAGTGGAGCAGAACTTGAAGAGAGAGAGAAGAACTGG
AAAGAGAAAAAGACCACGGAGTGG 3'

```

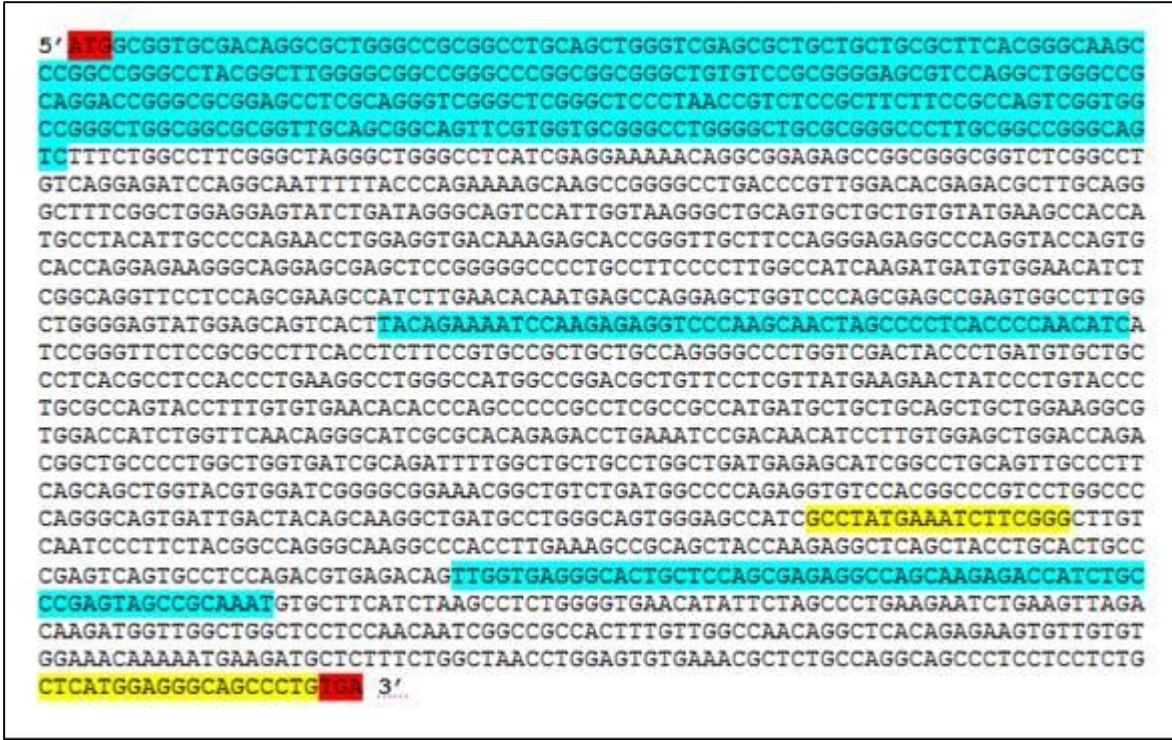
Şekil 4.1: SWAP70 kodlayan gen dizisi.

Kırmızı ile gösterilen diziler primer bölgeleri, baştaki ATG başlangıç kodonu ve sondaki TGA sonlanma kodonunu göstermektedir.

Ancak PINK1 geninin açık okuma çerçevesi göz önünde bulundurularak dizayn edilen primer çiftleri ile PZR yöntemi ile tam uzunlukta (full length olarak) amplifikasyonu gerçekleştirilemedi. Bunun için PINK1 geninin C-terminalinde yer alan bölgeyi içine alacak şekilde dizayn edilen primer çiftleri ile bu bölgenin PZR yöntemi ile amplifikasyonu yapıldı. (Şekil 4.2). Söz konusu

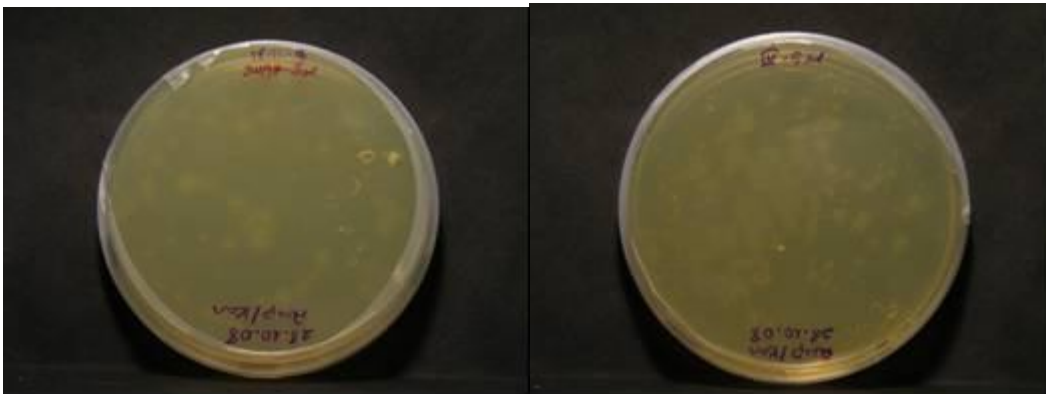
primer çiftlerinin 5' uçlarına eklenen restriksiyon dizileri ile restriksiyon bölgeleri oluşturularak enzim kesimi gerçekleştirildi.

Behçet hastalarında bilinmeyen otoantijenlerin bulunmasına yönelik SEREX yöntemi ile yapılan ön çalışmalarda PINK1 geninin sonunda yer alan bölgeye karşı otoreaktivite geliştiği gözlenmiştir. Bu nedenle PINK1 genindeki diğer bölgelerinin arasından genin sonunda yer alan bölge PZR yöntemi ile amplifiye edildi.



Şekil 4.2: PINK1 kodlayan gen dizisi.

Kırmızı renk ile gösterilen bölgeler başlangıç ve sonlanma kodonlarıdır. Mavi renk ile gösterilen bölgeler farklı epitop bölgelerini kodlayan dizilerdir. Sarı renk ile gösterilen bölgeler PINK1 PZR amplifikasyonu için gerekli primer çiftleridir.



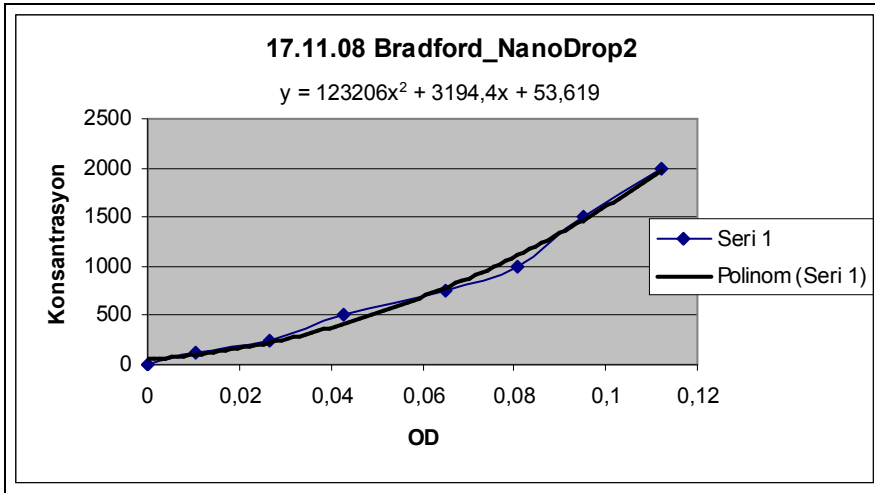
Şekil 4.3: Solda SWAP70' ait ve sağda PINK1'e ait transformasyon sonrasında üremenin gözlemlendiği petriler.

Amplifikasyonu ve Restriksiyon enzim kesimi yapılan DNA dizileri (SWAP70 ve PINK1 genleri) vektör (pQE-30) ile birleştirilerek E. coli M15 hücrelerine transforme edildi. PINK1 ve SWAP70 klonlarını içeren kolonilerin bulunduğu petriler Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

4.2. PINK1 ve SWAP70 Ekspresyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi:

PINK1 ve SWAP70 klonlarının 6xHis tag protein ekspresyonu ve ardından protein purifikasyonu, Ni-NTA resin kullanılarak oluşturulan matrikste Ni-NTA filtreli kolon (column) kullanılarak metal afinite kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirildi.

Protein purifikasyonunun ardından elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile Nano Drop cihazında 280 nm dalga boyu kullanılarak standartların optik dansiteleri (OD) ölçüldü. Bradford yöntemi kullanılarak çizilen grafik üzerinden proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı. Grafik 4.1’de Bradford standartlarına ait polinom grafiği ve bu grafiğin 2. dereceden formülü yer almaktadır.



Grafik 4.1: Bradford standart grafiği

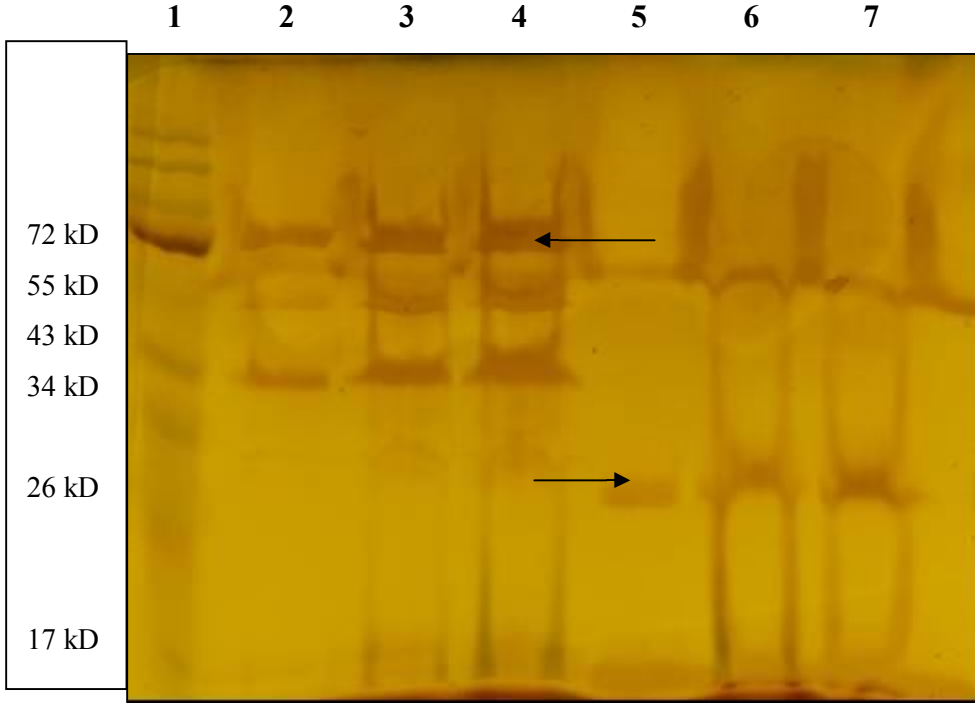
PINK1 ve SWAP70 proteinlerinin OD’leri ölçüldü ve standartlara göre çizilen polinom grafiğindeki formülden ($y=123206x^2+319,4x+53,619$) yararlanılarak konsantrasyonları hesaplandı:

SWAP70: 296,963 ug/ml

PINK1: 853,89 ug/ml.

Üretilen PINK1 ve SWAP70 proteinleri SDS-PAGE yöntemi ile görüntülendiğinde SWAP70 için 70 kD civarında ve PINK1 için 20 kD civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bu da üretilen proteinlerin doğru proteinler olarak purifiye edildiğini göstermektedir. SWAP70 ve

PINK1 protein bantları ile beraber gözlenen diğer nonspesifik bantların bakteriyel protein kontaminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4. SDS-PAGE görüntüsü. 1, marker; 2-4, SWAP70; 5-7, PINK1. Oklar SWAP70 ve PINK1 için doğru bantları göstermektedir.

4.3. ELISA SONUÇLARI:

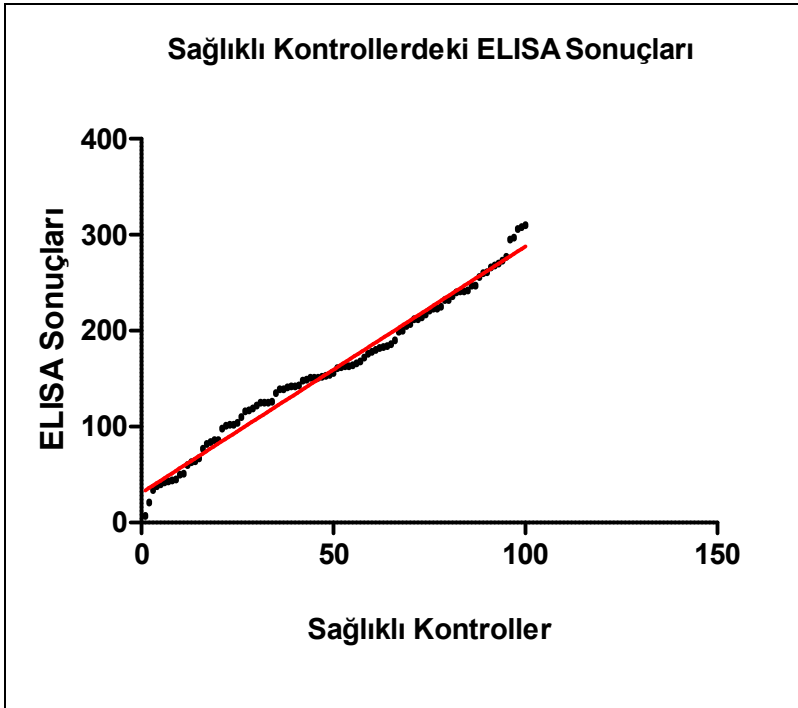
ELISA sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda PINK1 ve SWAP70 antijenlerine karşı Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde oluşacak antikor yanıtının değerleri, Graph Pad ve SPSS 13.0 programları kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

SEREX yöntemi ile PINK1 ve SWAP70 seropozitif olarak belirlenen bir grup Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneğinde, SWAP70 ve PINK1 antijenlerine karşı oluşan antikor yanıtının varlığı ELISA yöntemi ile tekrar değerlendirildi. Antikor yanıtı açısından ELISA ve SEREX sonuçları karşılaştırıldığında PINK1 seropozitifliği ELISA’da düşük titrasyonda saptandı. Fakat SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtı PINK1’e göre daha yüksek olarak gözlemlendi.

ELISA deneylerinde düşük değerlerde PINK1 seropozitiflik gözlenmesi durumunun, sentezlenen PINK1 proteininden kaynaklanabileceği düşünülerek PINK1 sentetik peptid (Abcam) satın alındı. Karşılaştırmalı olarak aynı hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi ile denemesi yapıldı. PINK1 sentetik peptid, PINK1 amino asit dizisi üzerindeki 484-504. amino asitleri içerir; klonlanıp sentezlenen PINK1’in içerdiği gen bölgesi ile aynıdır. ELISA sonuçları değerlendirildiğinde sentetik PINK1 peptidine karşı oluşan antikor yanıtı değerlerinin,

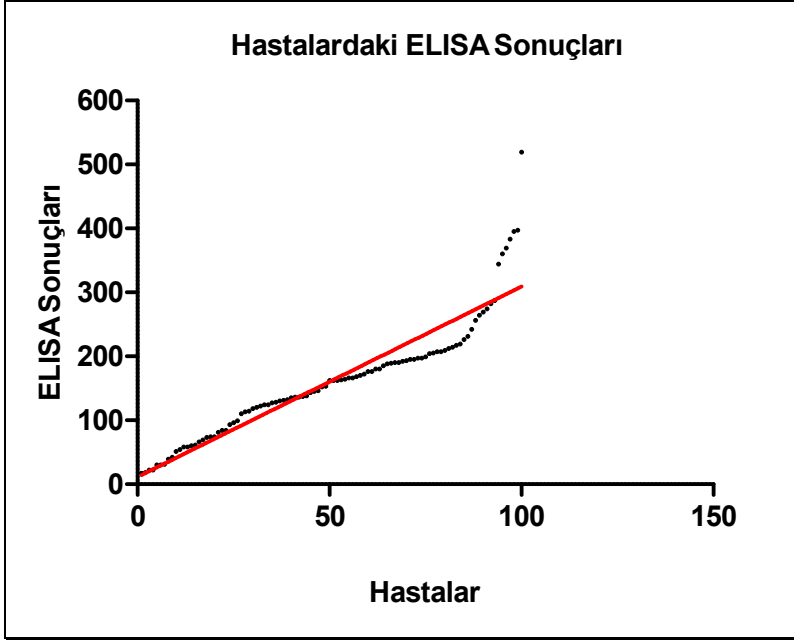
sentezlenen PINK1 proteininkinden farklı olmadığı görülmüştür. Hatta sentezlenen PINK1 proteinine karşı antikor yanıtının ELISA sonuçlarındaki değerlerinin ortalaması ($62,3125 \pm 35,942$), sentetik PINK1 peptidine göre ($20,25 \pm 10,063$) daha fazladır.

SEREX yöntemi ile yapılan çalışmada belirlenen SWAP70 seropozitif örnekler, ELISA yöntemi ile yapılan bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının Behçet hasta ($n=100$) ve sağlıklı kontrol ($n=100$) serum örneklerindeki ELISA sonuçlarından belirlenen değerleri Grafik 4.2 ve 4.3’de gösterilmiştir.



Grafik 4.2: SWAP70 antijeni için sağlıklı kontrollerdeki ELISA sonuçlarının dağılımları.

Hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde değerlendirilmiştir ve her iki gruptaki örneklerin ortalamaları karşılaştırılmıştır. Grafikler göz önünde bulundurulduğunda hasta grubundaki örneklerin sağlıklı kontrol grubundaki örneklere göre çok daha geniş aralıklarla dağılım gösterdiği gözlenmektedir.



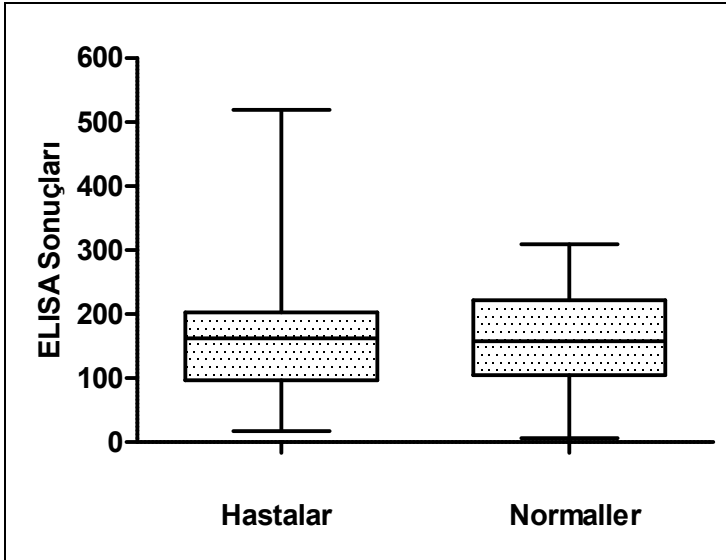
Grafik 4.3: SWAP70 antijeni için hastalardaki ELISA sonuçlarının dağılımları.

SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının Behçet hasta (n=100) ve sağlıklı kontrol (n=100) serum örneklerindeki ELISA değerlerinin ortalamaları sırasıyla 161.69 ± 92.69 ve 160.63 ± 75.09 şeklindedir. Ortalamanın üstündeki ve altındaki değerler, Fischer kesinlik testi ile değerlendirildiğinde p değeri 0.7774 olarak bulunmuştur; bu da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Her iki gruptaki ELISA sonuçlarından elde edilen değerlerinin ortalamaları Tablo 4.1’de verilmiştir. Güven aralığı (confidence interval) %95 olarak alındığında p değeri 0.9293 olarak bulunmuştur. Bu da hastalar ve kontroller arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.1: t-test sonucuna göre hastalar ve kontrollerdeki ortalama değerler

	Hastalar	Kontroller
Sayı (n)	100	100
Ortalama	161.69	160.63
SD	92.69	75.09

SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının Behçet hasta ve normal serum örneklerindeki aşırı uç değerlerden dolayı, hasta serum örneklerindeki değerler, normal kontrollere oranla göreceli olarak yüksektir (Grafik 4.4).



Grafik 4.4: SWAP70 antijeni için hastalarda ve normallerdeki ELISA sonuç değerleri.

Behçet hasta ve sağlıklı kontrollerde, SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının ELISA sonuçlarından elde edilen değerleri açısından +1SD, +2SD ve +3SD olarak standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu kesim noktaları alındığında hastalar ve normaller karşılaştırmalı olarak Fisher kesinlik testi ile değerlendirildiğinde p değerleri sırasıyla 0.4464, 0.0140, 0.2462 şeklindedir. +2SD değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunduğundan hastalardaki seropozitiviteyi değerlendirmek için bu değer kesim noktası olarak alınmıştır. Buna göre 7 hasta seropozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Hasta ve normal gruplarındaki seropozitif ve seronegatiflik.

	Hastalar (n)	Normaller (n)	P değeri
Seropozitiflik (n)	7	0	0.0140*
Seronegatiflik (n)	93	100	
Toplam	100	100	

* p değeri < 0.05

Çalışmada kullanılan Behçet hastaları gösterdikleri klinik özelliklerine göre 4 ana alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplar deri/mukoza, eklem, göz veya vasküler tutulum gösteren hastalardan oluşmaktadır. Seropozitif olarak bulunan 7 hasta klinik özelliklerine göre ayrılan alt gruplar açısından değerlendirildiğinde 2 hasta eklem, 2 hasta deri/mukoza, 2 hasta vasküler ve 1 hasta göz tutulumlu olarak belirlenmiştir. Seropozitif antikor varlığı ile Behçet hasta alt grupları arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. SWAP70'e karşı oluşan antikor yanıtının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımı Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3: SWAP70'e karşı oluşan antikör yanıtının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımı.

SWAP70 için	Eklem	Deri/Mukoza	Göz (Üveit)	Vasküler
Seropozitif hastalar (n)	2 (%6,9)	2 (%8,7)	1 (%5)	2 (%7,1)
Seronegatif hastalar (n)	27 (%93,1)	21 (%91,3)	19 (%95)	26 (%92,9)
Toplam hasta (%)	29	23	20	28

İstatiksel olarak, SWAP70 antikör yanıtının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımlarına bakıldığında, SWAP70'in gruplar arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca SWAP70 antikör varlığı tüm Behçet hasta alt gruplarında tutulumlu ve tutulumsuz hastalar arasında karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. SWAP70 antikör yanıtının Behçet Hastalığı alt gruplarında tutulumlu olan ve olmayan hastalar arasındaki dağılımı (A: Deri/mukoza tutulumlu olan ve olmayan hastalar, B: Göz tutulumlu olan ve olmayan hastalar, C: Eklem tutulumlu olan ve olmayan hastalar, D: Vasküler tutulumlu olan ve olmayan hastalar).

A	Deri/mukoza tutulumlu hastalar n (%)	Deri/mukoza tutulumu olmayan hastalar n (%)	p-değeri
SWAP70 seropozitif	2 (%8,7)	5 (%6,5)	0,659
SWAP70 seronegatif	21 (%91,3)	72 (%93,5)	

B	Göz tutulumlu hastalar n (%)	Göz tutulumu olmayan hastalar n (%)	p-değeri
SWAP70 seropozitif	1 (%5)	6 (%7,5)	1,00
SWAP70 seronegatif	19 (%95)	74 (% 92,5)	

C	Eklemler tutulumlu hastalar n (%)	Eklemler tutulumu olmayan hastalar n (%)	p-değeri
SWAP70 seropozitif	2 (%6,9)	5 (%7)	1,00
SWAP70 seronegatif	27 (%93,1)	66 (%93)	

D	Vasküler tutulumlu hastalar n (%)	Vasküler tutulumu olmayan hastalar n (%)	p-değeri
SWAP70 seropozitif	2 (%7,1)	5 (%6,9)	1,00
SWAP 70 seronegatif	26 (%92,9)	67 (%93,1)	

5. TARTIŞMA

Behçet Hastalığı bilinmeyen etiyojisi ile kronik inflamatuvar bir bozukluktur. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, hastalığın patogeneğinde önemli olduğu uzun zamandır öne sürülmektedir. Behçet hastalığında monosit ve lenfositlerin çeşitli sitokinleri artmış oranda eksprese ettiği bildirilmiştir. Genellikle Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış sekresyonu, hastalığın özellikle aktif döneminde belirgindir. Ayrıca hastalığın kliniksel aktivitesi ile birlikte seyreden oligoklonal T hücre genişlemesi, Behçet hastalığı immunopatogeneğinde antijen kaynaklı immun yanıtı gösterir (29).

Behçet hastalığının patogeneğinin belirlenmesine yönelik SEREX yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda PINK1 ve SWAP70 antijenlerine karşı otoantikör yanıtının oluştuğu gözlenmiştir (88).

Bu tez projesinde PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanarak ekspresyonlarının gerçekleştirilmesi ve elde edilen proteinlere/antijenlere karşı oluşacak otoantikör yanıtının Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

PINK1'in, apoptoza ve proteozomal inhibisyona karşı hücreleri koruduğu ve böylece PINK1 proteininin nöroprotektif bir rolünün olabileceği, yapılan fonksiyonel çalışmalarda gösterilmiştir (24). N-terminalinde mitokondriyal hedef motifi ve Ca/kalmodulin ailesinden serin/treonin kinazlara homoloji gösteren yüksek oranda korunmuş bir kinaz domain bulunduran PINK1 geni, 581 amino asitlik bir protein kodlar (24,44). PINK1 mRNA'sı en çok kalp, kas ve testislerde olmak üzere birçok insan dokusunda eksprese edilir, bu yüzden hücrede yararlı rollerinin olduğu düşünülmektedir (94).

SWAP70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm (switch) bölgesi substratları arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler. Aktive olmuş B hücre nükleusuna lokalize olduğu, ayrıca sitoplazmada da bulunabildiği belirlenmiş fakat kromatin ile sıkı bir ilişkisi gözlenmemiştir (7). SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu ve nükleer olayları aktive edebileceği, ayrıca membran ya da sitoplazma sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (89).

Bu çalışmada SEREX yöntemi ile PINK1 seropozitif olarak belirlenen bir grup Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneğinde, PINK1 antijenine karşı antikör yanıtının varlığını göstermek için ELISA yöntemi ile tekrar değerlendirildi. Antikör varlığının tayini açısından

ELISA ve SEREX sonuçları karşılaştırıldığında PINK1 seropozitifliği ELISA'da düşük değerlerde bulundu. Bunun üzerine eksprese/purifiye edilen PINK1 proteininin kontrolü amacı ile, ticari olarak satılan PINK1 sentetik peptid (Abcam) karşılaştırmalı olarak aynı hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi ile denenmiştir. ELISA sonuçları değerlendirildiğinde satın alınan PINK1 peptidine karşı oluşan antikor yanıtının ELISA değerlerinin, sentezlenen PINK1 proteininkinden çok farklı olmadığı görülmüştür. Bu durum üretilen PINK1 proteininin antijenik açıdan farklı olmadığını gösterir. Her iki antijen de ELISA yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde sentezlenen PINK1 proteininin ELISA değerlerinin ortalaması $62,3125 \pm 35,942$ ve satın alınan PINK1 peptidinin ELISA değerlerinin ortalaması $20,25 \pm 10,063$ olarak gözlenmiştir. Buradaki ortalamalar göz önüne alındığında sentezlenen PINK1 proteinine karşı oluşan antikor yanıtının ELISA değerlerinin, PINK1 peptidine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Farklı ekspresyon ve purifikasyon yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda kontaminasyon proteinlerinin yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği öne sürülmüştür (63). Bu durumda ELISA değerleri arasındaki farkın, sentezlenen PINK1 proteininin ekspresyonu ve purifikasyonu süreçlerinden kaynaklanan bakteriyel protein kontaminasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SEREX yöntemi ile yapılan çalışmalarda PINK1 pozitif olduğu belirlenmiş bir grup Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneğinde, bu çalışmada eksprese edilen PINK1 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının değerlendirilmesi için ELISA yöntemi ile denendiğinde düşük değerler gözlenmiştir. Aynı hasta ve kontrol grubunun sentezlenen PINK1 için ELISA yöntemi ile düşük değerler vermesinin nedeni her iki deney protokolü arasındaki farklardan dolayı olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir. SEREX çalışmalarında belirlenen pozitif klonun içerdiği antijenik protein, katlanma özelliklerinden ve konformasyonel yapısından dolayı klonlanıp sentezlenene göre farklılık gösterdiği göz önüne alınmaktadır. SEREX yönteminde eksprese olan PINK1 proteinindeki değişik konformasyonel olayların, farklı yapıda bir protein oluşumuna neden olabileceği ve bu proteine karşı oluşan antikor yanıtının farklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Ayrıca sentezlenen PINK1 proteininin purifikasyonunda protein kaybını en aza indirmek için 6xHis-tag yapı sayesinde elde edilmek istendiğinden dolayı denatüre edici koşullarda purifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein purifikasyonunun denatüre edici koşullarda yapılması, proteinin üç boyutlu yapısını bozabilmektedir. Bu durumda farklı konformasyonel yapıdaki proteine karşı farklı antikor yanıtının oluşabileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı PINK1 antijeninin Behçet hasta ve normal serum örneklerinde ELISA yöntemi ile belirlenen sonuçları değerlendirmeye alınmamıştır.

SEREX yöntemi ile yapılan ön çalışmalarda SWAP70 pozitif olduğu belirlenmiş bir grup Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneğinde SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının değerlendirilmesi için SWAP70 antijeni kullanılarak ELISA yöntemi ile denemesi yapılmış ve PINK1'e ait değerler ile karşılaştırıldığında daha yüksek ELISA değerleri gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre SWAP70 antijeninin Behçet hasta ve normal serum örneklerinde ELISA yöntemi uygulandı ve sonuçları değerlendirildi.

ELISA yöntemi ile yapılan bu çalışmada pozitif kontrol olarak, SEREX yöntemi ile yapılan çalışmadan elde edilen SWAP70 seropozitif örnekler kullanılmıştır. Fakat ELISA sonuç hesaplaması için alt ve üst değerleri belirlemeye yönelik, standart olarak kullanılacak ve antikor titrasyonu bilinen pozitif örneklerin bulunmamasından dolayı hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde değerlendirilmiştir. SEREX yöntemi ile yapılan ön çalışmalardan elde edilen SWAP70 pozitif serum örnekleri standart olarak kullanılacak kadar yüksek pozitivite göstermediğinden dilüsyon eğrisi kullanılmamıştır. Sonuçların değerlendirilmesi için hasta grubundaki ve sağlıklı kontrol grubundaki örneklerin ELISA değerlerinin ortalamaları alınmıştır (2,56). Hasta ve sağlıklı kontrollerin ortalaması sırasıyla 161.69 ± 92.69 ve 160.63 ± 75.09 şeklindedir. Hasta grubundaki örneklerin kontrol grubundaki örneklere göre daha uç değerlerinin bulunduğu ve çok daha geniş aralıklarla dağılım gösterdiği gözlenmektedir. Kontrollerdeki ortalamanın üzerindeki değerler hastalarda ve sağlıklı kontrollerde karşılaştırıldığında her iki grupta da sayıca yakın olduğu anlaşılmıştır ($p=0.7774$). Ortalamaların değerlendirilmesi için uygulanan t-test'te p değeri 0.9293 olarak bulunmuştur. Bu da hastalar ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. SWAP70 antijeni için gözlenen ELISA değerleri, belirli sayıdaki Behçet hastalarında ($n=100$) ve sağlıklı kontrollerde ($n=100$) belirlenmiş ve bu değerlerin özellikle hastalarda geniş aralıklarla dağılım sergileyerek değişkenlik gösterebileceği anlaşılmıştır. Behçet hasta ve sağlıklı kontrollerde, SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının ELISA sonuçlarından elde edilen değerleri açısından +1SD, +2SD ve +3SD olarak standart sapmaları hesaplanmıştır (11,44). +2SD değeri istatistiksel olarak anlamlı olduğundan hastalardaki seropozitiviteyi değerlendirmek için bu değer kesim noktası olarak alınmış ve 7 hasta seropozitif olarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan Behçet hastaları gösterdikleri klinik özelliklerine göre 4 ana alt gruba ayrılmıştır: Deri/mukoza, eklem, göz ve vasküler tutulum. 7 seropozitif hasta klinik özelliklerine göre ayrılan alt gruplar açısından değerlendirildiğinde 2 hasta eklem, 2 hasta deri/mukoza, 2 hasta vasküler ve 1 hasta göz tutulumlu olarak belirlenmiştir. Seropozitif olarak belirlenen hastalardaki

organ tutulumlarının belli bir organa spesifik olmadığı ve tutulumların bu hastalarda homojen olarak dağılım gösterdiği anlaşılmıştır.

ELISA sonuçlarına göre seropozitif ve seronegatif hastalardaki organ tutulumları belirlenmiş ve alt gruplar ilk önce kendi aralarında, daha sonra belli bir organ tutulumu olan ve olmayanlar açısından değerlendirilmiş fakat anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışılan alt gruplardaki hasta sayılarının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamış olabilir. Bu yüzden daha geniş hasta populasyonunda alt grup analizlerinin yapılması, Behçet hastalarında SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının daha iyi belirlenmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmada PINK1 ve SWAP70 genleri klonlanarak ekspresyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen proteinlere/antijenlere karşı oluşan otoantikor yanıtı Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. PINK1 için yapılan ELISA deneyleri sonucunda hastalarda ve de normallerde düşük değerlerde antikor varlığının görülmesinin non-spesifik olduğu düşünüldü. Gelecekte PINK1 antijenine ait yeni optimizasyon deneyleri planlanabilir. SEREX deneyleri ile yapılan ön çalışma sonuçlarına göre SWAP70 antijenine karşı antikor varlığı vasküler tutulumla ilişkili bulunmasına rağmen ELISA deneylerinden elde edilen sonuçlarda SWAP70 antijenlerine karşı gelişen antikor yanıtının Behçet hasta alt grupları ile anlamlı bir bağlantısı olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile ilk defa PINK1 ve SWAP70 antijenlerinin ELISA deneyleri Behçet hastalarında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Abbas A. K., Lichtman A. H. Temel İmmunoloji (İmmun sistemin işlev ve bozuklukları). İstanbul Medikal Yayıncılık 2007; 161-173. 26.
2. Adışen E., Aral A., Aybay C. Salivary epidermal growth factor levels in Behçet's Disease and recurrent aphthous stomatitis. *Dermatology* 2008;217:235–240.
3. Beere HM. Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2633–2639.
4. Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, et al. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 5703–5708.
5. Birtaş-Ateşoğlu E., İnanç N., Yavuz S. Serum Levels of free heat shock protein 70 and anti-HSP70 are elevated in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(4 Suppl 50): S96-8.
6. Borggreffe T., Keshevarzi S., Gross B. Impaired IgE response in SWAP70-deficient mice. *Eur.J.Immunol.*2001;31, 2467-2475.
7. Borggreffe T., Masat L., Wabl M. Cellular, intracellular and developmental expression patterns of murine SWAP-70. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29, 1812-1822.
8. Borggreffe T., Wabl M., Akhmedov A. T. A B-cell-specific DNA recombination complex. *Journal of Biological Chemistry* 1998; Vol 373, No 27, 17025-17035.
9. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 9103–9108.
10. Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 7783–7788.
11. Chen LC., Khouatra C., Atakan S. Anti-SOX2 Antibody Response is an Independent Prognostic Marker of Favorable Outcome in Patients with Small Cell Lung Cancer. (Yayınlanmamış bilgi)
12. Clark I.E., Dodson M.W., Jiang C. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature Letters.* 2006; Vol. 441, doi:10.1038,1162-1166.

13. Current protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience 2009.
14. Delunardo F., Conti F., Margutti P. Identification and characterization of the carboxy-terminal region of Sip-1, a novel autoantigen in Behçet's disease. *Arthritis Research & Therapy* 2006; Vol 8, No 3, 1-8.
15. Direskeneli H. Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens and HLA-B51. *Ann Rheum Dis* 2001; 60, 996-1002.
16. Direskeneli H, Eksioğlu-Demiralp E, Yavuz S, Ergun T, Shinnick T, Lehner T. T cell responses to 60/65 kD heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease. *J Rheumatol.* 2000;27:708–13.
17. Direskeneli H, Hasan A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Fortune F, Recognition of B cell epitopes of the 65 kDa HSP in Behçet's disease. *Scand J Immunol.* 1996;43:464–471.
18. Durmazlar S. P., Akgül A., Eskiöğlü F. Homocysteine may involve in the pathogenesis of Behçet's disease by inducing inflammation. *Mediators of Inflammation.* 2008; 407972.
19. Ehrlich GE. Vasculitis in Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 1997;14:81–8.
20. Eksioğlu-Demiralp-E, Direskeneli H, Ergun T, Fresko I, Akoglu T. Increased CD4+CD16+ and CD4+CD56+ T cell subsets in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 1999;19, 23–6.
21. Fei Y., Webb R., Cobb BL. Identification of novel genetic susceptibility loci for Behçet's disease using a genome-wide association study. *Arthritis Research and Therapy.* 2009; Vol 11, No 3.
22. Feng XG., Ye S., Lu Y. Antikinectin autoantibody in Behçet's disease and several other autoimmune connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(4 Suppl 45), S80-5.
23. Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB. Polypeptide, phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol* 1982; 93: 103–10.
24. Gandhi S., Muqit M. M. K., Stanyer L. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129, 1720-1731.
25. Gegg M. E., Cooper J. M., Schapira A. H. V. Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in DOPAMINERGIC cells. *Plos One* 2009; Vol 4, Issue 3, e4756.

26. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4078–83.
27. Gross B., Borggreffe T., Wabl M. SWAP-70-deficient mast cells are impaired in development and IgE-mediated degranulation. *Eur. J. Immunol* 2002; 32, 1121-1128.
28. Gupta S., Lee A., Hu C. Molecular cloning of IBP, a SWAP70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system. *Human Immunology*. 2003; 64, 389-401.
29. Gül A. Behçet's disease: An update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19 (Suppl. 24), S6-S12.
30. Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y. Role of gamma delta T cells in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1996; 347:789–94.
31. Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56: 424–7.
32. Hilpela P., Oberbanscheidt P., Hahne P. SWAP70 Identifies a transitional subset of actin filaments in motile cells. *Mol. Bio. Cell*. 2003; Vol. 14, 3242-3253.
33. Hofmann K, Stoffel W. TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem* 1993; 374: 166.
34. Jin Y., Fuller L., Ciancio G. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cell derived from human bone marrow. *Human Immunology*. 2004; 65, 93-103.
35. Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, Nagafuchi H, Nakajima T, Wakisaka S. Characterization of T cells specific for an epitope of human 60 kD heat shock protein (hsp) in patients with Behçet's disease in Japan. *Clin Exp Immunol*. 1997;108:204–11.
36. Karasneh J., Gul A., Ollier WE. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behçet's Disease. *Arthritis & Rheumatism* 2005; Vol. 52, No. 6, pp 1836–1842.
37. Kidd D., Steuer A., Denman A. M. Neurological complications in Behçet's syndrome. *Brain* 1999; 122, 2183-2194.
38. Kimbara N., Dohi N., Miyamoto M. Diagnostic surface expression of SWAP70 on HIV-1 infected T cells. *Microbiol. Immunol*. 2006; 50(3), 235-242.

39. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605–8.
40. Kobayashi M., Katagiri T., Kosako H. Global analysis of dynamic changes in lipid raft proteins during T-cell activation. *Electrophoresis*. 2007; 28, 2035-2043.
41. Kurhan-Yavuz S, Direskeneli H, Bozkurt N, Ozyazgan Y, Bavbek T, Kazokoglu H. Anti-MHC autoimmunity in Behçet's disease: T cell responses to an HLA-B derived peptide cross-reactive with retinal-S antigen in patients with uveitis. *Clin Exp Immunol* 2000;120:162–6.
42. Lin W., Kang U. J. Characterization of PINK1 processing, stability and subcellular localization. *Journal of Neurochemistry* 2008; 106, 464-474.
43. Liu W., Vives-Bauza C., Acin-Perez R. PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteosomal deficit and α -synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *Plos One* 2009; Vol 4, Issue 2, e4597.
44. Lo'pez G., Escobar GI., Ayala SM. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. *Veterinary Microbiology*. 2006; 116, 232–238.
45. Marongiu R., Brancati F., Antonini A. Whole gene deletion and splicing mutations expand the *PINK1* genotypic spectrum. *Human Mutation*. 2007; doi: 10.12.
46. Masat I., Caldwell J., Armstrong R. Association of SWAP70 with the B cell antigen receptor complex. *PNAS*. 2000; Vol. 97, no. 5, 2180-2184.
47. Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, Horie M, Hori K. Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42503–42515.
48. McGonagle D., McDermot M. F. A proposed classification of the immunological diseases. *Plos Medicine* 2006; Vol 3, Issue 8, e297.
49. Mei Y., Zhang Y., Yamamoto K. FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *PNAS* 2008; doi 10.1073.
50. Mills R., Sim C. H., Mok S. S. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *Journal of Neurochemistry* 2008; 105, 18-33.
51. Mizuki N, Ota M, Yabuki K. Localization of the pathogenic gene of Behcet's disease by microsatellite analysis of three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 3702-8.

52. Moriwaki Y., Kim Y.J., Ido Y. L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/Cdc37 chaperones rapidly degraded in a proteasome-dependent manner. *Neuroscience Research* 2008; 61, 43–48.
53. Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 11–22.
54. Murugan A., Ihara S., Tokuda E. SWAP-70 is Important for invasive phenotypes of mouse embryo fibroblasts transformed by v-src. *IUBMB Life.* 2008; 60(4), 236-240.
55. Muqit M. M. K., Abou-Sleiman P., Saurin A. Altered cleavage and localization of PINK1 to aggresomes in the presence of proteosomal stress. *Journal of Neurochemistry* 2006; 98, 156-169.
56. Nouredin BN., Al-Haddad CE., Bashshur Z. Plasma thymulin and nerve growth factor levels in patients with primary open angle glaucoma and elevated intraocular pressure. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244: 750–752.
57. Oberbanscheidt P., Balkow S., Kühnl J. SWAP70 associates transiently with macropinosomes. *European Journal of Cell Biology.* 2007; 86, 13-24.
58. Ocana-Morgner C., Wahren C., Jessberger R. SWAP-70 regulates RhoA/RhoB-dependent MHCII surface localization in dendritic cells. *Blood* 2009; doi 10.1182.
59. Okunuki Y., Usui Y., Takeuchi M., Kezuka T. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res.* 2007; 84(5):823-31.
60. Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem.* 2004; 279: 8506–8515.
61. Özışık H. I., Altınayar S., Özcan A. C. Behçet Hastalığında Nörolojik Tutulum. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 12(4) 239-242.
62. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature.* 2006; 441: 1157–1161.
63. Pearce G., Angeli V., Randolph G.J. Signaling protein SWAP-70 is required for efficient B cell homing to lymphoid organs. *Nature Immunology.* 2006; 7, 827 – 834.
64. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 2005; 280: 34025–32.

65. Pridgeon J., Olzman J., Chin L.S. PINK1 Protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLOS Biology*. 2007; Vol 5, Issue 7, e172.
66. Quemeneur L., Angeli V., Chopin M. SWAP70 deficiency causes high-affinity plasma cell generation despite impaired germinal center formation. *Blood*. 2008; Vol. 111, no. 5, 2714-2724.
67. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
68. Schmetzer O., Moldenhauer G., Riesenberger R. Quality of recombinant protein determines the amount of autoreactivity detected against the tumor-associated epithelial cell adhesion molecule antigen: Low frequency of antibodies against the natural protein. *The Journal of Immunology* 2005; 174, 942–952.
69. Schmitter T., Pills S., Sakk V. The granulocyte receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3) directly associates with Vav to promote phagocytosis of human pathogens. *The Journal of Immunology*. 2007; 178, 3797–3805.
70. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M. An in vitro model of Parkinson's disease: Linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*, 2002; 22: 7006–7015.
71. Shinohara M., Terada Y., Iwamatsu A. SWAP70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signaling of membrane ruffling. *Nature*. 2002; Vol. 416, 759-763.
72. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Maria-Valente E. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*. 2005; 14: 3477–92.
73. Sim CH, Lio DS, Mok SS, Masters CL, Hill AF. C-terminal truncation and Parkinson's disease-associated mutations down-regulate the protein serine/threonine kinase activity of PTEN-induced kinase-1. *Hum Mol Genet*. 2006; 15: 3251–3262.
74. Sivalenka R.R., Jessberger R. SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; Vol. 24, no. 23, 10277–10288.
75. Sohn S, Lee ES, Bang D, Lee S. Behçet's disease-like symptoms induced by the herpes simplex virus in ICR mice. *Eur J Dermatol* 1998; 8, 21–3.

76. Sohn S, Lee ES, Kwon HJ, Lee SI, Bang D, Lee S. Expression of Th2 cytokines decreases the development of and improves Behçet's disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in mice. *J Infect Dis* 2001;183: 1180–6.
77. Souza RC, Lage L, Goldesntein-Schainberg C. Anti-endothelial cell antibodies and central nervous system involvement in Behçet's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62(6):685- 90.
78. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839–40.
79. Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T. Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 1994;97:226–31.
80. Tanaka T, Yamakawa N, Koike N, Suzuki J, Mizuno F, Usui M. Behçet's disease and antibody titers to various heat-shock protein 60s. *Ocular Immunology and Inflammation* 1999;7:69–74.
81. Taşçı B, Direskeneli H, Serdaroglu P, Akman-Demir G, Eraksoy M, Saruhan-Direskeneli G. Humoral immune response to myco-bacterial heat shock protein (hsp) 65 in the cerebrospinal fluid of neuro-Behçet patients. *Clin Exp Immunol* 1998;113:100–4.
82. Taymans J. M., Haute C. V., Baekelandt V. Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain. *Journal of Neurochemistry*. 2006; Vol. 98, Issue 3, 951-961.
83. The QIAexpressionist (A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins). Qiagen 2003.
84. Thureau SR, Diedrichs-Mohring M, Fricke H, Burchardi C, Wildner G. Oral tolerance with an HLA-peptide mimicking retinal autoantigen as a treatment of autoimmune uveitis. *Immunol Lett* 1999;68:205–12.
85. Touitou I., Kone'-Paut I. Autoinflammatory diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2008; Vol. 22, No. 5, pp. 811–829.
86. Unoki M., Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001 ; 20, 4457-4465.
87. Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56: 336–41.

88. Vural B., Demirkan A., Uğurel E. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's Disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009. (Yayınlanmamış bilgi)
89. Wakamatsu I., Ihara S., Fukui Y. Mutational analysis on the function of the SWAP-70 PH domain. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 293, 137-145.
90. Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ. MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behçet's disease. *Immunogenetics* 1999; 49: 613-17.
91. Wang D, Qian L, Xiong H, Liu J, Neckameyer WS, et al. (2006) Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13520–13525.
92. Wang H. L., Chou A.H., Yeh T.H. PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome c. 2007; YNBDI-01529, No. of pages: 11, 4C.
93. Weihofen A., Thomas K. J., Ostaszewski B. L. Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 2009; 48, 2045-2052.
94. Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Yao Z. PINK1 Is Necessary for Long Term Survival and Mitochondrial Function in Human Dopaminergic Neurons. *Plos One* 2008; Vol 3, Issue 6, e2455.
95. Xiong H., Wang D., Chen L. Parkin, PINK1 and Dj-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *Journal of Clinical Investigation* 2009; Vol 119, No 3, 650-660.
96. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129–1132.
97. Yang Y., Ouyang Y., Yang L. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *PNAS* 2008; Vol 105, 7070-7075.
98. Zierhut M., Mizuki N., Ohno S. Immunology and functional genomics of Behçet's disease. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60, 1903-1922.
99. Zhao C., Yang P., He H. Retinal S-antigen Th1 cell epitope mapping in patients with Behçet's disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247, 555-560.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU:

Sayı/Tarih:

Sayın Bay/Bayan.....

Çalışmanın Adı: PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanmasıyla Elde Edilen Proteinlerin Behçet Hastalarında ELISA Yöntemi ile Taranması

Çalışmanın amacı ve açıklaması: Bu çalışma Behçet Hastalığının sebeplerini ve muhtemel tedavi yöntemlerini araştırmak amacıyla yapılmaktadır. Çalışmanın gerçekleşebilmesi için 100 hasta materyaline ihtiyaç vardır. Bu hastalığın nedenlerini araştırmak amacıyla kan örneği bağışlamanız istenmektedir.

Lütfen aşağıdaki maddeleri dikkatle okuyunuz.

1- Sizden ve daha birçok Behçet hastası ve sağlıklı kontrollerden toplanacak olan kan örnekleri, bu örneklerden elde edilecek serum, DNA ve RNA materyalleri, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında saklanacak ve bu konuda çalışma yapmak isteyen bilim adamlarının kullanımına **kontrollü şekilde** açık tutulacaktır.

2- Kan örnekleri alım anından itibaren numaralandırılacak, size ait kişisel bilgiler şifre korumalı bir bilgisayarda saklanacak ve hiçbir durumda 3. kişilerle paylaşılmayacaktır.

3- Yapılacak bilimsel çalışmalar genellikle çok sayıda örnekle yürütülecek ve bu çalışmalardan toplu sonuçlar çıkacaktır. Bu nedenle, çalışmanın kısa vadedeki sonuçlarından direkt olarak sizin veya ailenizin diğer bireylerinin yararlanması söz konusu olmayabilir. Bununla beraber, vereceğiniz kan örnekleri sayesinde, bu hastalığın tam olarak anlaşılmasını, yeni tedavi ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacak çalışmaların yapılabilmesi mümkün olacaktır.

4- Bağışladığınız bu kan örneğinin size maddi bir getirisi olmadığı gibi sizden ya da sosyal güvence kurumunuzdan hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

5- Behçet Hastalığı konusunda yapılacak olan bilimsel çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla kan vermenizin vücudunuz için herhangi bir zararlı etkisi yoktur ve kan vermek için her zaman almakta olduğunuz ilaçları kesmeniz ya da aç durmanız gerekmemektedir. Kan alımı sonrasında damarınız üzerinde zedelenmeye bağlı geçici bir kızarıklık ya da morluk oluşabilir.

6- Kan örneği verip vermemek konusunda ve istediğiniz anda bu çalışmadan çıkmak konusunda özgürsünüz. Bu çalışmalara katılmayı ve kan vermeyi kabul etmeseniz de, bu merkezde yürütülen tedaviniz normal seyrinde devam edecektir.

7- Bu çalışmada yukarıda belirtilen analizlerden başka bir analiz yapılmak istenmesi halinde size ulaşılarak ayrı bir onay alınacaktır.

8- Yürümekte olan çalışmaların genel sonuçları hakkında Prof. Dr. Uğur Özbek'ten bilgi alabilir ve bu doktora 0212 414 20 00'dan 33314 nolu iç hat telefon numarasından ulaşabilirsiniz.

Bir önceki sayfada ‘‘PINK1 ve SWAP70 Genlerinin Klonlanmasıyla Elde Edilen Proteinlerin Behçet Hastalarında ELISA Yöntemi ile Taranması ‘‘ başlıklı çalışma ile ilgili, gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kan vermeyi, dolayısıyla adı geçen bilimsel projeye destek olmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı

İmzası

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisinin:

Adı-Soyadı İmzası

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin:

Adı-Soyadı İmzası

Tarih:/...../.....

BEHÇET HASTALIĞI İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Tarih

Aşağıda yazılı bilgileri okudum. Behçet hastalığının genetiğine/moleküler biyolojisine/immunolojisine yönelik araştırmalar için kan vermeyi kendi rızamla kabul ediyorum.

Hastanın Adı-Soyadı:

İmzası:

Ebeveynin Adı-Soyadı:

İmzası:

Aileden sorumlu kişinin Adı-Soyadı:

İmzası:

Örneği alan araştırmacının Adı-Soyadı:

İmzası:

Çalışmanın kapsamı:

1. Yapılması planlanan genetik/moleküler biyoloji/immunolojik incelemeler için sizden öncelikle 10 x2 ml kan örneği alınacaktır.
2. Alınan kan örneğinden DNA/RNA/serum materyali izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.
3. Hastalığınıza neden olduğu düşünülen genlerde mutasyon, hastalığa spesifik füzyon gen tespiti ve polimorfizm taraması yapılacaktır. Ayrıca hastalığınıza neden olduğu düşünülen proteinlere ait ekspresyon çalışmaları yapılacaktır.
4. Hastalığa neden olan yeni genlerin DNA/RNA örneğinizde genetik haritalama çalışmaları yapılacaktır.
5. Araştırma kapsamında yapılan çalışmaların süresi kesin değildir ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.
6. Araştırma sırasında genetik/moleküler biyoloji/immunolojik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
7. Elde edilen genetik bilgi sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup, sadece size ve hekiminize bildirilecek, üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 26/11/2008
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu
Toplantı Sayısı : 11

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Uğur ÖZBEK'in üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Tıbbi Biyolog Elif UĞUREL'in yürüteceği 2008/3002 protokol numaralı "PINK1 ve SWAP70 genlerinin klonlanmasıyla elde edilen proteinlerin behçet hastalarında ELISA yöntemi ile taranması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Araştırma Fonu tarafından desteklenmek şartı ile uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
 Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN (Katılmadı)
 Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
 İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
 Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
 Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
 Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)
 Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
 Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
 İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU
 Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR
 Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. İlgün ÖZDEN
 Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
 İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
 Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
 Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
 Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif	Soyadı	Uğurel
Doğ.Yeri	Bursa	Doğ.Tar.	21.04.1983
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	33637189404
Email	elifugurel@yahoo.com	Tel	537 8424129

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Tıbbi Biyolojik Bilimler, Cerrahpaşa Tıp Fak., İst. Üni.	2005
Lise	Milli Piyango Anadolu Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	63	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınlari/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası

Roche Diagnostics Light Cyler 480 Eğitimi Sertifikası

1. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi ve 4. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu Katılım sertifikası
7. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Katılım sertifikası
5. Ulusal Epilepsi Kongresi Katılım Sertifikası
10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Katılım Sertifikası
8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Katılım Sertifikası

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik

