

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

**(DOKTORA TEZİ)**

**KIR3DL1 ALELLERİNİN BEHÇET HASTALIĞI  
PATOGENEZİNDEKİ YERİ**

**JÜLİDE DUYMAZ TOZKIR**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. AHMET GÜL**

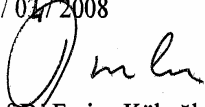
**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI  
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2008**

## TEZ ONAYI

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


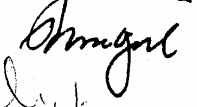
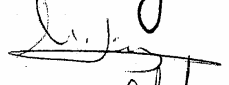
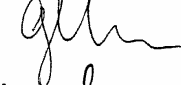

01 / 01 / 2008

  
Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : İmmünoloji  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
Anabilim Dalı : İmmünoloji  
Tez Sahibi : Jülide Duymaz Tozkır  
Tez Başlığı : KIR3DL1 Allellerinin Behçet Hastalığı Patogenezindeki Yeri  
Sınav Yeri : İ.Ü. DETAE  
Sınav Tarihi : 25 / Mart / 2008

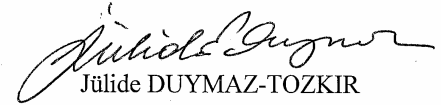
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Günnur Deniz, İ.Ü. DETAE, İmmünoloji Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Ahmet Gül, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD 
3. Prof. Dr. Murat İnanç, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD 
4. Prof. Dr. Güher Saruhan Direskeneli, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD 
5. Prof. Dr. Işıl Barlan, Marmara Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD 

**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.



Jülide DUYMAZ-TOZKIR

## İTHAF

Sevgili Anneme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bilimsel anlamda beni yetiştiren ve çalışmalarımın her aşamasında desteğini, emeğini esirgemeyen, çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Güher Saruhan Direskeneli ve Sayın Prof. Dr. Ahmet Gül'e, anlayışlı yaklaşımı ile bana destek olan hocam Sayın Prof. Dr. Günnur Deniz'e, teşekkür ederim.

Metodun geliştirilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Paul Norman'a, gönderdiği kontrol DNA örnekleri için Sayın Mary Carrington'a teşekkür ederim.

Başta Dr. Tıbbi Biyolog Sibel Yentür ve Msc. Biyolog Vuslat Yılmaz olmak üzere her türlü sorunumda yardımları ve manevi destekleri ile yanımda olan Dr. Çiğdem Türkmen-Anaç, Dr. Özgül Gergin-Cimşit, Dr. İlker Kayı ve tüm sevgili arkadaşlarıma, deney aşamalarındaki değerli yardımlarından dolayı sevgili Aslı Uğurlu'ya teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca beni destekleyen, her zaman yanımda olan canım aileme, akşamları tüm yorgunluğumu benden alan biricik Nil'e, sabır ve hoşgörü ile bana her türlü desteği veren kıymetli eşim Dr. Hilmi Tozkır'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T752/13052005

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN .....	İİİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Behçet Hastalığı.....	3
2.1.1. Behçet Hastalığının Epidemiyolojisi .....	4
2.1.2. Behçet Hastalığının Etiyopatogenezi.....	4
2.1.3. Behçet Hastalığında Genetik Faktörler .....	7
2.2. KIR Molekülleri .....	8
2.2.1. KIR Moleküllerinin İsimlendirilmesi ve Genel Özellikleri .....	8
2.2.2. KIR Gen Düzeni ve Haplotipik Çeşitliliği .....	12
2.2.3. KIR Moleküllerinin Ligand Özgüllüğü.....	15
2.2.4. KIR3DL1/DS1 Moleküllerinin Özellikleri .....	16
2.3. KIR Genleri ve Hastalık İlişkileri.....	18
2.3.1. KIR ve Patojenler.....	18
2.3.2. KIR, Otoimmünite ve İnflamatuvar Hastalıklar .....	19
2.3.3. KIR ve Behçet Hastalığı.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışma Grubu.....	22
3.2. DNA İzolasyonu .....	22
3.3. KIR Gen İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem.....	23
3.4. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem .....	24

3.4.1. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Şablon Kullanılarak Değerlendirilmesi.....	26
3.5. HLA-B Tiplendirilmesi.....	26
3.6. Deneysel Aşamalarda Kullanılan Malzeme ve Cihazların Listesi .....	28
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin Değerlendirilmesi.....	30
4.1.1. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin Tüm Çalışma Grubundaki Değerlendirilmesi. 31	
4.1.2. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin HLA-Bw4 ile Birlikte Değerlendirilmesi .....	31
4.1.3. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin HLA-B*51 ile Birlikte Değerlendirilmesi.....	33
4.2. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Değerlendirilmesi .....	35
4.2.1. KIR3DL1/DS1 Alel Dağılımının Tüm Çalışma Grubundaki Değerlendirilmesi .....	35
4.2.2. KIR3DL1/DS1 Alel Dağılımının HLA-Bw4 ile Birlikte Değerlendirilmesi ...	36
4.2.3. KIR3DL1/DS1 Alellerinin HLA-B*51 ile Birlikte Değerlendirilmesi.....	38
5. TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR .....	46
ETİK KURUL KARARI.....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	57

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: KIR moleküllerinin yapısal özellikleri ve bilinen ligandları - Vilches ve Parham (2002)'den değiştirilerek.....	10
Tablo 2-2: KIR alel sayıları - <a href="http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html">http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html</a> ' den alınmıştır. ...	11
Tablo 3-1: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizisi	24
Tablo 3-2: KIR3DL1/DS1 Alellerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizisi ....	24
Tablo 3-3: KIR3DL1 alelleri için kullanılan primer karışımları, çoğaltılan ürünlerin büyüklükleri, PCR programı yapışma dereceleri ve alellere göre değerlendirme şablonu .....	26
Tablo 3-4: HLA-B tiplendirmesinde kullanılan primerlerin dizileri.....	27
Tablo 3-5: HLA-B primerleri ile oluşturulan primer karışımları, çoğaltılan ürün büyüklükleri, sonuçları değerlendirme şablonu .....	27
Tablo 3-6: Deneysel aşamalarda kullanılan malzeme ve cihazların listesi .....	28
Tablo 4-1: HLA-B verisinin çalışma grubu içerisindeki dağılımı .....	30
Tablo 4-2: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif grup içerisindeki dağılımı	32
Tablo 4-3: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B*51 negatif gruptaki dağılımı.....	34
Tablo 4-4: KIR3DL1/DS1 alellerinin tüm çalışma grubundaki dağılımı.....	35
Tablo 4-5: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı.....	36
Tablo 4-6:KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B*51 negatif alt gruptaki dağılımı.....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: KIR moleküllerinin isimlendirilmesi .....	11
Şekil 2-2: KIR geninin organizasyonu- Vilches ve Parham (2002)'den değiştirilerek...	12
Şekil 2-3: KIR genlerinin 19.kromozom üzerindeki ve LRC içindeki yerleşimi - http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html'den değiştirilerek alınmıştır. ....	13
Şekil 2-4: KIR haplotiplerini oluşturan gen içerikleri - Parham (2005)'den değiştirilerek. .....	14
Şekil 3-1: KIR3DL1 alelleri değerlendirilirken kullanılan agaroz jel fotoğrafı örneği ..	25
Şekil 4-1: Çalışma grubu değerlendirme diagramı .....	30
Şekil 4-2: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin tüm çalışma grubundaki dağılımı (SK: sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	31
Şekil 4-3: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	32
Şekil 4-4: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 negatif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları).....	33
Şekil 4-5: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B*51 pozitif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	33
Şekil 4-6: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B*51 negatif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	34
Şekil 4-7: KIR3DL1/DS1 alellerinin tüm çalışma grubundaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	36
Şekil 4-8: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	37
Şekil 4-9: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 negatif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	37
Şekil 4-10: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B*51 pozitif alt gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	38
Şekil 4-11: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B*51 negatif alt gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları) .....	39
Şekil 5-1: Çeşitli çalışmalardaki KIR3DL1/DS1 alel dağılımlarının karşılaştırılması...	41

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

AIDS: Edinsel immün yetersizlik sendromu (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

DAP12: DNAX aktive edici protein 12kDa

EtBr: Etidyum bromür

HSV: *Herpes simplex* virüs

HSP: Isı şoku proteini (Heat shock protein)

IFN $\gamma$ : İnterferon gama

Ig: İmmünoglobülin

IL: İnterlökin

IL2R: IL2 reseptör

ITIM: İmmünoresptörün tirozin bazlı inhibisyon motifi

ITAM: İmmünoresptörün tirozin bazlı aktivasyon motifi

LRC: Lökosit reseptör kompleksi

MHC: Major doku uyumluluğu kompleksi

MIC-A: MHC sınıf I zinciri ile bağlantılı gen A

NK: Doğal öldürücü hücre (Natural killer)

HCV: Hepatitis C virüs

HIV: İnsan immün yetersizlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus)

HLA: İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)

HLA-Bw4: Bw4 alellerini içeren HLA grubu

HLA-Bw4I80: Amino asit dizisi 80. pozisyonda izolösin bulunan HLA-Bw4 alelleri

HLA-C<sup>Asn80</sup>: Amino asit dizisi 80. pozisyonda asparjin bulunan HLA-C alelleri

HLA-C<sup>Lys80</sup>: Amino asit dizisi 80. pozisyonda lizin bulunan HLA-C alelleri

HLA-Cw6: Cw6 alellerini içeren HLA grubu

KIR: Doğal öldürücü hücre immünoglobülin benzeri reseptör

OD: Optik yoğunluk

OR: Risk oranı (Odd Ratio)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR-SSP: PCR diziyeye özgü primer

PsA: Psöriatik artrit

RA: Romatoid artrit

Th1: Yardımcı T hücre 1

THR: T hücre reseptörü

TM: Hücre zarı ile temas bölgesi (Transmembran region)

TNF $\alpha$ : Tümör nekroz faktör alfa

SDS: Sodyum dodesil sülfat

ZAP70: Zeta ( $\zeta$ ) eşlikçi 70kD protein

## ÖZET

Duymaz Tozkır, J. (2008). KIR3DL1 Alellerinin Behçet Hastalığı Patogenezindeki Yeri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Behçet hastalığı tekrarlayan oral ve genital ülserasyonlar, üveit ve deri lezyonları ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığının HLA-B\*51 ve zayıf da olsa HLA-B\*2702 ile ilişkisi patogenezinde genetik faktörlerin rol aldığını göstermektedir. HLA-B\*51 ve B\*2702 alelleri ortak olarak Bw4 motifi taşımaktadır ve doğal katil hücrelerin immünoglobulin benzeri reseptörlerinden (KIR) 3DL1 ile bağlanma bölgeleri aynıdır. Bu çalışmada KIR3DL1/DS1 genine ait farklı alellerin dağılımı ve bunların HLA-Bw4 ile birlikteliğinin Behçet hastalığı patogenezine katkısı araştırılmıştır.

Çalışma grubu 241 Behçet hastası (BH), 235 sağlıklı kontrolden (SK) oluşmaktadır. Önce KIR3DL1/DS1 gen içeriğine, sonra KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*006, \*007,\*008 ve KIR3DS1\*013 alellerine polimeraz zincir reaksiyonu-diziye özgü primerler kullanılarak bakılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda  $\chi^2$  testi kullanılmıştır.

KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin incelendiği ilk aşamada HLA-Bw4 taşıyan BH ve SK karşılaştırıldığında, KIR3DL1/DL1 genotipi Behçet hastalığı görülme riskini 1,7 kat arttırmaktadır (95% CI 1.1-2.6, P = 0.013). HLA-B\*51 negatif alt grupta da KIR3DL1/DL1 genotipi BH'da anlamlı olarak artmış bulunmuştur (68.1% vs. 54.5%, P = 0,03; OR = 1.8, 95%CI 1.1-3.0). İkinci aşamada KIR3DL1/DS1 geninin \*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*006, \*007, \*008, \*013 alellerinin dağılımı belirlenmiştir. Tüm çalışma grubu değerlendirildiğinde BH'da KIR3DL1\*001 alellinin sıklığı yüksek (BH:%51,2 ve SK:%39,8; OR = 1,58; %95 GA 1-2,32. P = 0,018), KIR3DS1\*013 alelinin sıklığı da anlamlı olarak düşük bulunmuştur (BH:%34 ve SK:%46,3; OR = 0.59; %95 GA 0.4-0.88, P = 0.009). HLA-Bw4 taşıyan BH ve SK'ler karşılaştırıldığında da, BH'da KIR3DL1\*001 aleli artmış, KIR3DS1\*013 aleli azalmış oranda bulunmuştur. HLA-Bw4 motifi taşıyan ama B\*51 negatif olan alt grup analizinde de, aynı şekilde BH'da KIR3DL1\*001 alelinin sıklığı anlamlı olarak yüksek (BH:%64,6 ve SK:%32,1; OR = 3,8; %95 GA 1.8-8,1, P < 0.0001), KIR3DS1\*013 alelinin sıklığı ise anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (BH:%25 ve SK:%60,5; OR = 0.2; %95 GA 0.09-0.48, P < 0.0001).

Behçet hastalarında KIR3DL1\*001 alelinin artmış olması, KIR3DS1\*013 alelinin azalmış olması, Bw4 epitopu ile KIR3DL1/DS1 etkileşiminin Behçet hastalığı patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir. KIR3DL1/DS1 alelleri hücre yüzeyinde farklı düzeylerde eksprese olmakta ve farklı inhibisyon kapasitesi göstermektedir. Bu bağlamda HLA-KIR etkileşimi Behçet Hastalığının gelişimine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, genetik yatkınlık, HLA-Bw4, KIR3DL1, KIR3DS1.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T752.

## ABSTRACT

Duymaz-Tozgir, J. (2008). Distribution of Killer Immunoglobulin-like Receptor 3DL1 Alleles in Behçet's Disease. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. PhD Thesis. Istanbul.

Behçet's Disease (BD) is a systemic inflammatory disorder mainly characterised by recurrent attacks of oral and genital ulcerations, skin lesions, uveitis. The etiopathogenesis of BD is unknown. The pathogenic significance of the strong association with HLA-B\*51 and weak relation with B\*2702 has yet to be identified. HLA-B\*51 and B\*2702 shared the Bw4 epitope that can bind to a group of highly polymorphic receptors expressed on natural killer (NK) cells, which are known as killer immunoglobulin-like receptors 3DL1 (KIR). We aimed to analyse the role of KIR3DL1/DS1 alleles and their existence with the respective HLA-B ligands, namely alleles with Bw4 motif in the pathogenesis of BD.

A group of 241 patients with BD and 235 healthy controls comprised the study group. All individuals were genotyped for the KIR3DL1/DS1 gene content. Thereafter KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*007, \*008 and KIR3DS1\*013 alleles were determined by PCR- sequence specific primers. Frequencies and the existence of 3DL1/S1 alleles with their respective ligands HLA-Bw4 or -B\*51 have been compared by using chi-square test.

In the gene content assessment, ligand positive individuals, homozygous 3DL1 genotype was associated with 1.7-times increased the risk for BD (95% CI 1.1-2.6, P = 0.013). In the comparison of BD patients and controls according to their HLA-B51 status, a significant increase of 3DL1/3DL1 genotype (68.1% vs. 54.5%, P = 0,03; OR = 1.8, 95%CI 1.1-3.0) was detected in B51-negative patients compared to B51-negative controls. The overall group comparison of KIR3DL1/DS1 alleles, KIR3DL1\*001 allele was significantly increased (51.2% vs. 39.8%, OR: 1.58, 95% CI: 1-2.32, p= 0.018), whereas KIR3DS1\*013 allele was significantly less frequent in BD patients compared to controls (34% vs. 46.3% OR: 0.59, 95% CI: 0.4-0.88, p= 0.009). Among the Bw4 carrying groups, the increase of KIR3DL1\*001 and decrease of KIR3DS1\*013 allele frequencies were more prominent in HLA-B51 negative patients (64.6% vs. 32.1%, OR: 3.8, 95%CI: 1.8-8.1, p<0.0001 for KIR3DL1\*001 and 25% vs. 60.5%, OR: 0.2, 95%CI: 0.09-0.48 p<0.0001 for KIR3DS1\*013).

Selective increase of KIR3DL1\*001 and decrease of KIR3DS1\*013 allele frequencies in BD suggest that interaction of Bw4 epitopes with KIR3DL1/S1 molecules may have a role in the pathogenesis of BD. As the KIR3DL1/S1 alleles exhibit different expression levels and different inhibitory capacities, this association may suggest that a HLA-KIR interaction may have a functional significance in the development of BD.

**Key Words:** Behçet Disease, genetic susceptibility, HLA-Bw4, KIR3DL1, KIR3DS1.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No. T752).



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Behçet hastalığı tekrarlayan oral aftlar, genital ülserler, üveit ve deri lezyonları ile karakterize olan inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığı deri-mukoza ve gözler dışında eklemeleri, merkezi sinir sistemini, gastrointestinal sistemi, akciğerleri, her çeşit ve büyüklükteki damarları da etkileyebilen sistemik bir vaskülit olarak kabul edilmektedir. Behçet hastalığının nedeni bilinmemektedir. Bununla beraber genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde çeşitli mikroorganizmalarla veya diğer çevresel faktörlerle tetiklenen immünolojik bozuklukların patogenezdaki rolünün önemli olduğu düşünülmektedir. Behçet hastalığının insan lökosit antijeni (HLA)-B\*51 ile ilişkisi patogeneзде genetik faktörlerin rol aldığını gösteren en güçlü bulgudur. HLA-B\*51'in Behçet hastalığı gelişimine nasıl katkıda bulunduğu halen tam olarak bilinmemektedir. HLA-B\*51 ile hastalık arasındaki ilişkinin, HLA-B\*51 molekülünün patogeneзде doğrudan görev alabileceğine işaret edebileceği gibi, HLA-B lokusuna yakın bir başka hastalık-yatkınlık geni ile bağlantı dengesizliğine de bağlı olabileceği düşünülmüştür (Gül A, 2001). HLA-B\*51 dışındaki HLA-B alellerinin Behçet hastalığı ile ilişkisine bakıldığında, HLA-B\*2702 aleli ile Behçet hastalığı arasında zayıf bir ilişki olduğu görülmüştür. Yapılan göreceli yatkınlık etkileri (relative predispositional effects - RPE) analizinde, B\*51 alelleri hasta ve sağlıklı kontrollerden çıkartıldıktan sonra kalan HLA-B alelleri ile tekrarlanan incelemede B\*2702 aleli ile Behçet hastalığı arasındaki zayıf bir ilişki gösterilebilmiştir. HLA-B\*51 ve B\*2702 alellerinin dizileri karşılaştırıldığında, 77-83. pozisyonlardaki amino asitler arasına denk gelen Bw4 motifinin ortak olduğu görülmüştür. Bu ortak dizinin özellikle doğal öldürücü (NK, Natural Killer) hücreler üzerinde bulunan doğal öldürücü hücre immünoğlobülin benzeri reseptörlerden (KIR, Killer Ig-like Receptor) KIR3DL1'i bağladığının bilinmesi dikkat çekici bulunmuştur (Gül A, 2002).

KIR reseptörleri, NK hücreleri, CD4<sup>+</sup> αβ, CD8<sup>+</sup> αβ ve γδ T hücreleri gibi lenfoid hücre alt gruplarında bulunan düzenleyici moleküller grubunun bir üyesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KIR gen lokusunda çok sayıda poligenik ve multi-alelik polimorfizm olduğu saptanmıştır. KIR genlerinin hücreler üzerinde klonal olarak ekspresse olması sistemin karmaşıklığına ilave katkı sağlamaktadır (Vivier ve Anfossi, 2004).

KIR3DL1, HLA-Bw4 alelleri için özgül bir inhibitör reseptör olarak tanımlanmıştır (Gumperz ve ark, 1995). KIR3DL1 genine ait çok sayıda alel belirlenmiştir (Gardiner ve ark, 2001). Genetik ve protein dizilimi açısından KIR3DS1, KIR3DL1'in kısa sitoplazmik kuyruklu allotipidir ve KIR3DS1, KIR3DL1'in aleli olarak kabul edilmektedir (Uhrberg ve ark, 1997; Wilson ve ark 2000; Gardiner ve ark 2001). KIR3DS1'in ligandı kesin olarak bilinmemektedir. Hücre dışı yapısındaki benzerlikten ötürü HLA-Bw4 motifini bağlayabileceği öne sürülmektedir (Martin, Gao ve ark, 2002; Martin, Nelson ve ark, 2002).

KIR moleküllerinin değişik toplumlardaki dağılım farklılıkları, belirli hastalıklarla fonksiyonel ilişkisine bağlı olabilir. İnsan immün yetmezlik virusü (HIV) ile infekte hastalarda yapılan bir çalışmada, KIR3DS1 ve HLA-Bw4 genotipi taşıyan hastalarda klinik bulgularda edinsel bağışıklık yetersizliği sendromuna progresyonun, bu KIR-HLA birlikteliğini taşımayan hastalara göre, daha yavaş olduğunu gösterilmiştir (Martin, Gao ve ark, 2002).

Bu tez çalışmasında KIR3DL1/DS1 geni ile Behçet hastalığı arasındaki ilişkinin KIR3DL1/DS1 alelleri düzeyinde bulunduğu ve belirli fonksiyonel özelliği olan alellerle ilişkiye bağlı olarak hastalık patogenezine katkıda bulunduğu hipotezi sınanmaktadır. Bu amaçla önce KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerdeki dağılımı belirlenmiş, HLA-Bw4 taşıyan alt grupta yapılan incelemede hem tüm grupta, hem HLA-B\*51 negatif Behçet hastalarında KIR3DL1 / KIR3DL1 genotipi, sağlıklı kontrollerden daha fazla bulunmuştur. KIR3DL1/DS1 geninin incelenen çok sayıda popülasyonda daha sık rastlanan KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*006, \*007, \*008 (Valiante ve ark. 1995; Gardiner ve ark. 2001) ve KIR3DS1\*013 (Uhrberg ve ark. 1997) alellerinin Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerdeki dağılımı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)- diziye özgü primer (SSP) kullanılarak belirlenmiştir.

KIR3DL1/DS1 genine ait bugüne kadar tanımlanan alellerin bazı fonksiyonel farklılıkları olduğu gösterilmiştir (Gardiner, 2001; Yawata, 2006). Bu nedenle KIR3DL1/DS1 alellerinin tanımlanması, Behçet hastalığı ile KIR3DL1/DS1 arasındaki ilişkinin fonksiyonel önemini tanımlamada büyük yararlar sağlayabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Behçet Hastalığı

Behçet hastalığı tekrarlayan oral aftlar, genital ülserler, üveit ve deri lezyonları ile karakterize olan inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığı deri-mukoza ve gözler dışında eklemleri, merkezi sinir sistemini, gastrointestinal sistemi, akciğerleri, her çeşit ve büyüklükteki damarları da etkileyebilen sistemik bir vaskülit olarak kabul edilmektedir (Gül 2001).

Behçet Hastalığı Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından 1937 yılında, tekrarlayan oral ve genital ülserasyonlar ile hipopiyonlu üveitten oluşan üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (Behçet 1937). Ancak hastalığın tarihçesi Hipokrat'a kadar uzanmaktadır. Hipokrat M.Ö. 450'deki yazılarında Behçet hastalığına benzer klinik bulguları olan olguları bildirmiştir. Hastalığın farklı bulguları başka yazarlar tarafından da gözlenmişse de, bu bulgular genellikle tüberküloz, sifiliz, sepsis, allerji, stafilokok infeksiyonları gibi başka hastalıklara bağlı olarak yorumlanmıştır. İlk kez Prof. Dr. Hulusi Behçet bu bulguların tek bir hastalığa bağlı olabileceğini bildirmiştir (Dilşen 1997). Yaptığı patolojik, anatomik ve mikrobiyolojik çalışmalarla, daha çok viral etiyojoloji üzerinde durmuştur (Behçet 1940).

Behçet hastalığı, akut alevlenme ve iyileşme dönemleri ile kronik seyir gösteren, inflamatuvar bir hastalıktır. Kadınlarda ve erkeklerde yaklaşık olarak eşit oranda görülmektedir. Hastalık sıklıkla 20-30 yaşları arasında başlamaktadır. Hastalığın genç erkeklerde daha ağır seyrettiği ve ciddi organ lezyonlarının erkeklerde daha sık gözleendiği bildirilmiştir (Yazıcı ve ark. 1984). Oral aftöz ülserler hastalığın başlangıç bulgusu olarak tanımlanmaktadır. Oküler lezyonlar, genital ülserasyonlar, deri lezyonları (özellikle eritema nodosum), artropati, nörolojik belirtiler ve damar tutulumları hastalığın diğer bulguları olarak sıralanabilir. Hastalığın mortalitesi % 0 - 6,3 arasında değişmektedir. Merkezi sinir sistemi tutulumu, akciğer tutulumu ve büyük damar tutulumları başlıca mortalite nedenleridir (Kural-Seyahi ve ark. 2003). Behçet hastalığının tedavi seçenekleri hastanın klinik bulgularına göre değişkenlik göstermektedir (Gül, 2007).

### 2.1.1. Behçet Hastalığının Epidemiyolojisi

Behçet hastalığının görülme sıklığı Orta Doğu ve Akdeniz'e komşu ülkelerden Japonya'ya kadar 30° ile 45° kuzey enlemleri arasında kalan ülkelerde daha fazladır. Bu bölge tarihi İpek Yolu'na denk düştüğü için İpek Yolu Hastalığı olarak da anılmaktadır (Verity ve ark. 1999). Mitokondriyal DNA çalışmaları, İpek Yolu'nda seyahat eden Doğu Asyalılar ve Avrupalılar arasında gen alışverişinin olduğunu göstermektedir. Behçet hastalığına yatkınlık genlerinin de, bu yol üzerinde ticaret yapan veya göç eden kavimlerle yayılmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu bölgede yaşayan sağlıklı bireylerde HLA-B\*51 pozitifliğinin, diğer coğrafi bölgelerden daha yüksek olması da artmış prevalansa katkıda bulunabilir (Gül 2001).

Ülkemizde Behçet hastalığı prevalansı 8 - 42/10 000 olarak bildirilmiştir (Azizlerli ve ark. 2003). Japonya'da bu oran yaklaşık olarak 7 - 13/100 000'dir. Kuzey Avrupa ülkelerinde ve Amerika'da bu sıklık 1/100 000 altına inmektedir (Yurdakul 1997). Benzer etnik kökenli, fakat farklı enlem ve boylamlardaki yerleşim yerlerinde yaşayan popülasyonlarda Behçet hastalığı prevalansının değiştiği gösterilmiştir. Farklı bölgelerde yaşayan Türk popülasyonlarındaki Behçet hastalığı prevalansı arasında yaklaşık 18 kat fark olduğu bildirilmiştir. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde Behçet Hastalığı prevalansı 370/100 000 olarak bildirilirken, Berlin-Almanya'da yaşayan Türkler arasında yapılan çalışmada Behçet hastalığı prevalansı 21/100 000 olarak bildirilmiştir (Zouboulis 2003). Japonya'da Hokkaido bölgesindeki Japonlar ile Amerika-Hawai'deki Japonlar arasında hastalığın görülme sıklığı yaklaşık 30 kat farklıdır. Doğu ile Batı bölgeleri arasında saptanan bu farklar, hastalığın başlamasında ya da gelişiminde, çevresel bir faktörün veya faktörlerin önemli olabileceğine işaret etmektedir (Zouboulis 2003).

### 2.1.2. Behçet Hastalığının Etiyopatogenezi

Behçet hastalığının nedeni bilinmemektedir. Bununla beraber genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde çeşitli mikroorganizmalarla veya diğer çevresel faktörlerle tetiklenen immünolojik bozuklukların patogenezdaki rolünün önemli olduğu düşünülmektedir.

Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşmesi sonucunda çeşitli immünolojik bozukluklar meydana gelmektedir. Bu bozukluklar polimorfonükleer ve mononükleer hücrelerde gözlenen çeşitli fenotipik ve fonksiyonel bulguları içermektedir (Gül 2001).

Çeşitli dokulardan alınan örneklerde yapılan histo-patolojik çalışmalarda, mikst (karışık) karakterde bir hücre infiltrasyonu tanımlanmıştır. Farklı lezyonlarda farklı hücrelerin rol oynayabildiği ve ayrıca lezyonların süresinin (yaşının) hücre tipi ile ilişkili olabileceği söylenmektedir. Yapılan incelemelerde hastalığa özgü kabul edilebilecek histopatolojik bulgular tanımlanamamıştır (Akoğlu 1997). Behçet hastalarında nötrofil kemotaksisinin (Chajek-Shaul ve ark. 1987) ve fonksiyonel aktivitesinin (Pronai ve ark. 1991) de arttığı gösterilmiştir.

Behçet hastalığının patogeneğinde, hücrel immün cevaptaki değişiklikler önemli yer tutmaktadır. Yardımcı T hücre-1 (Th1) sitokinlerin salınımında artış ve humoral immün cevapta fonksiyon bozuklukları bildirilmiştir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde, *Herpes simplex* virüsü (HSV) (Eglin ve ark. 1982) veya *Streptococcus sanguis* (Lehner ve ark. 1991) başta olmak üzere çeşitli streptokok suşlarının, hastalık bulgularının ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir. İnsan mitokondriyal ısı şoku proteini (heat shock protein - HSP) ile Behçet hastalığında rolü olduğu iddia edilen mikrobiyal ajanların (HSV-1, mikobakteri ve streptokok gibi) HSP'leri arasında benzerlik gösterilmiştir. HSP, hücrelerin değişik stresler karşısında ürettikleri ve hücrenin korunmasını sağlayan yapılardır. Mikrobiyal HSP'lerin belirli epitoplarının Behçet hastalığında özgül immün yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Pervin ve ark. 1993; Direskeneli 2001). Behçet hastalarında mikobakteri 65 kD HSP peptidlerine karşı immünoglobülin (Ig)-A ve IgG sınıfı antikorların serum seviyeleri, kontrollerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Lehner ve ark. 1991). Nörolojik tutulumu olan Behçet hastalarında, beyin-omurilik sıvısında anti HSP IgG antikor indeksinin de artmış olduğu saptanmıştır (Tascı ve ark. 1998).

Behçet hastalığının önemli bir özelliği inflamatuvar yanıtta nonspesifik artıştır. Behçet hastalarının serumlarındaki sitokin düzeyleri hastalığın aktif ve inaktif dönemlerinde farklılıklar gösterir (Gul 2003). İnaktif Behçet hastalarının serumlarındaki interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) düzeyleri artmış olarak bulunmuş, ancak hastalığın alevlenme döneminde azalmış olarak saptanmıştır (Fujii ve ark. 1983). Mege ve arkadaşları (1993) aktif Behçet hastalarının monositlerinden spontan salınan tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin (IL)-6 ve IL-8'i artmış olarak bulmuştur. Aynı çalışmada in vitro lipopolisakkarit ile uyarılan monosit kültürlerinde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 hem inaktif hem aktif Behçet hastalarında yüksek bulunmuştur. Aktif Behçet hastalarının IL-2 üreten CD4+ hücreleri artmış olarak saptanmıştır (Sugi-Ikai ve ark. 1998). Fakat Behçet

hastalarının konkanavalin-A ile uyarılmış T hücrelerinin eksojen IL-2'ye karşı proliferatif cevabı, sağlıklı kontrollere göre azalmış olarak saptanmıştır. Behçet hastalarının makrofajlarından salınan baskılayıcı maddeler, T hücrelerinde görülen bu zayıf cevabın sebebi olarak düşünülmüştür (Sakane ve ark. 1986). Ayrıca aktif hastalarda yüksek afiniteli IL-2 reseptörlerinin (IL-2R) ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Dolaşan IL-2R konsantrasyonunun ise hem remisyondaki hem de alevlenme dönemindeki Behçet hastalarında sağlıklı kontrollerden yüksek olduğu görülmüştür (Hamzaoui ve Aayed 1990a). Anti-CD3 ile uyarılmış periferik kan monositlerinden *in vitro* kültür ortamına salınan IL-10 düzeyi Behçet hastalarında artmış olarak bulunmuş (Raziuddin ve ark. 1998), Ancak serum IL-10 düzeyleri romatoid artrit ve sağlıklı kontrollerden farklı bulunmamıştır (Mantas ve ark. 1999).

Behçet hastalığında hem alfa-beta ( $\alpha\beta$ ) hem de gama-delta ( $\gamma\delta$ ) T hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinde bozukluk bildirilmiştir. Hücre içi sitokin ekspresyon paternleri ve baskın olarak Th1 hücrelerde görülen nükleer transkripsiyon faktörü olan T-bet ekspresyonu Th1 polarizasyonunun varlığına işaret etmektedir (Li ve ark. 2003). Behçet hastalarında gösterilen oligoklonal T hücre artışı ile klinik aktivite arasındaki ilişki, antijenle uyarılan immün cevabın patogeneze önemli katkısı olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte Behçet hastalarındaki artmış T hücre cevabının belirli antijenler ile sınırlı olmaması başka nedenlerin sinyal geçişlerini etkilediğini göstermektedir (Direskeneli 1999). Dolaşan kandaki T hücrelerinin sayısına dair yapılan çalışmalarda çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Esin ve arkadaşları (1997) Behçet hastalarında  $CD4^+$  T hücrelerini artmış olarak bildirmiştir.  $\gamma\delta$  T hücreleri, özellikle  $CD8^+$   $\gamma\delta$  T hücreleri de sağlıklı kontrollere göre Behçet hastalarında yüksek bulunmuştur (Freysdottir ve ark. 1999). Antijene özgül IFN- $\gamma$  salınımı yapan bu hücrelerin major doku uyumluluğu kompleksi (MHC) sınıf I zinciri ile bağlantılı gen A (MICA) molekülleri ile bağlanabileceği ileri sürülmektedir (Nishida ve ark. 2003). Behçet hastalarında NK hücrelerinin de sayıca arttığı bildirilmiş, ancak bu hücrelerin sitotoksik aktivitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir (Hamzaoui ve ark. 1990b; Kaneko ve ark. 1985). Başka bir çalışmada da sadece  $CD4^+$   $CD56^+$  ve  $CD4^+$   $CD16^+$  T hücre alt gruplarının sayısının arttığı, NK hücrelerinin sayısının sağlıklı kontrollere göre aynı kaldığı gösterilmiştir (Ekşioğlu-Demiralp 1999).

### 2.1.3. Behçet Hastalığında Genetik Faktörler

Genetik faktörlerin patogeneze katkısını gösteren bulgulardan ilkinin Behçet hastalığının coğrafi dağılımı oluşturmaktadır. Behçet hastaları arasında çok sık olmamakla birlikte ailevi vakaların gözlenmesi, hastalığın patogenezendeki genetik faktörleri düşündürdüğü bir diğer bulgudur. Behçet hastalığı Mendel kuralları ile kalıtımı olan genetik bir hastalık değildir. Hastaların çoğu aile öyküsü olmayan sporadik vakalardan oluşmaktadır (Gül 2001). Bununla birlikte Behçet hastalığının ailevi birikimi uzun zamandır bilinmektedir ve birinci derece akrabalar arasında risk artışı olduğu gösterilmiştir. Ülkemizdeki hastaların %8-18'inin aile öyküsünde başka Behçet hastalarının olduğu saptanmıştır. Hastaların kardeşleri arasında Behçet hastalığı görülme oranı %4,2 olarak bulunmuştur. Behçet hastalığının toplumumuzdaki prevalansı ile karşılaştırıldığında kardeşlerde hastalık görülme risk oranı ( $\lambda_s$ ) 11,4 - 52,5 olarak bulunmuştur (Gül ve ark. 2000). Bu değer genetik faktörlerin katkısının önemli olduğunu göstermektedir.

Behçet hastalığının HLA-B\*51 ile ilişkisi patogeneze genetik faktörlerin rol aldığını gösteren en güçlü bulgudur. HLA-B\*51'in Behçet hastalığı gelişimindeki rolü halen tam olarak bilinmemektedir. HLA-B\*51 doğrudan patogeneze katkıda bulunabileceği gibi, HLA-B lokusuna komşu bir yakınlık geni ile bağlantı dengesizliğini gösteriyor olabilir (Gül 2001). HLA-B lokusuna komşu diğer genomik segmentlerin araştırılması, MICA'nın Behçet hastalığı ile güçlü ilişkisini açığa çıkarmıştır. HLA-B'ye 46-kb sentromerik bölgede yer alan MICA geninin MICA\*009 alelinin, Behçet hastalığı riskini artırdığı gösterilmiştir. (Mizuki ve ark. 1999). Behçet hastalığı ile güçlü genetik ilişkinin HLA-B\*51 ile olduğu gösterilmiş, MICA dahil diğer tüm ilişkiler HLA-B\*51'in bağlantı dengesizliği ile açıklanmıştır (Gül , Hajeer, Worthington, Barret ve ark. 2001). Bağlantı dengesizliği, MHC bölgesi içinde de çok geniş mesafelere erişebilir. HLA-B\*51 haplotipi üzerindeki MICA ya da diğer komşu genlerin, genetik yakınlığa bireysel katkıları değerlendirilmekte oldukça zordur (Gül, Hajeer, Worthington, Ollier ve ark. 2001). HLA-B\*51 dışındaki HLA-B alellerinin Behçet hastalığı ile ilişkisine bakıldığında, HLA-B\*2702 aleli sıklığının Behçet hastalarında artmış olduğu görülmüştür. Yapılan göreceli yakınlık etkileri (relative predispositional effects - RPE) analizinde, B\*51 alelleri hasta ve sağlıklı kontrollerden çıkartıldıktan sonra kalan HLA-B alelleri ile tekrarlanan incelemede B\*2702 aleli ile Behçet hastalığı arasında zayıf bir ilişki olduğu gösterilmiştir. HLA-B\*51 ve B\*2702

alellerinin dizileri karşılaştırıldığında, 77-83. pozisyonlardaki amino asitler arasındaki Bw4 motifinin aynı olduğu görülmüştür. Bu ortak dizinin özellikle NK hücreleri üzerinde bulunan KIR moleküllerinden KIR3DL1'i bağlama özelliği taşıması fonksiyonel önem taşıyabilir (Gül 2002).

## 2.2. KIR Molekülleri

KIR, lenfoid hücrelerin alt gruplarında bulunan düzenleyici moleküller grubunun bir üyesidir. Bu reseptörlerin rolü ilk olarak NK hücrelerinin sitolitik etkilerini spesifik olarak göstermesinde tanımlanmıştır (Moretta ve ark. 1990). Bu nedenle NK hücre inhibe edici reseptörler (**K**iller **I**nhibition **R**eceptors) olarak adlandırılmış, ancak reseptörlerin fonksiyonları ve yapısı daha ayrıntılı tanımlandığında NK hücre Ig benzeri reseptör (**KIR** - **K**iller **I**mmunoglobulin like **R**eceptor) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra sadece NK hücrelerinde değil, CD4<sup>+</sup> αβ, CD8<sup>+</sup> αβ, ve γδ T hücrelerine ait alt gruplarda da eksprese olduğu gösterilmiştir (Vivier ve Anfossi 2004).

KIR ailesi üyeleri HLA-A, -B, -C alellerinin tanınmasında aracılık ederler. Bu reseptörlerin keşfi HLA sınıf I moleküllerinin fonksiyonları hakkında ilave bilgiler sağlamıştır. KIR izotipleri ile HLA alellerinin etkileşimi, IFNγ, TNF-α gibi sitokinlerin salgılanmasını, sitotoksik aktivitenin durdurulması veya başlatılması gibi efektör fonksiyonların düzenlenmesini sağlamaktadır. İnhibe edici KIR izotipleri ile ligandı olan HLA Sınıf I moleküllerinin etkileşimi, sağlıklı hücreleri NK hücre aracılı spontan sitolitik aktiviteden korumaktadır. Diğer bazı KIR izotiplerinin de NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Böylece KIR genleri immün cevabın kontrolünde oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Parham 2005).

### 2.2.1. KIR Moleküllerinin İsimlendirilmesi ve Genel Özellikleri

Gen bankasında KIR ailesine ait yüzden fazla mRNA ve DNA dizisi bulunmaktadır. Bu genlerin isimlendirilmesinde daha çok protein yapılarına göre yapılan isimlendirme sistemi kullanılmaktadır. KIR proteinleri üç kriter göz önüne alınarak sınıflandırılır: Hücre dışındaki Ig ilmekleri, sitoplazmik kuyruk uzunluğu ve dizi benzerliği.

KIR molekülleri hücre dışında 2 veya 3 ilmeği (D) bulunan tip I membran proteinleridir ve amino ucu hücre dışında yer alır. Yani bu reseptörler hücre dışı ilmeklerine göre 2D veya 3D olarak ikiye ayrılmaktadır. Hücre dışı ilmeklerinden

bağımsız olarak, hücre içerisindeki sinyal ileti bölümleri uzun (L) veya kısa (S) olabilmektedir.

Hücre içi sinyal ileti kuyruğu uzun (L) olan reseptörlerin üzerinde bir veya iki tane “İmmünoresptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM)” bulunmaktadır ve bu nedenle inhibitör etki gösterirler. ITIM dizisi (V/IxYxxL/V) içindeki tirozin fosforillendiğinde hücre içindeki SHP-1 fosfataz aktiflenir ve inhibisyon sinyalinin iletilmesi sağlanır.

Hücre içi uzantısı kısa (S) olan KIR molekülleri hücreye dolaylı yoldan aktivasyon sinyalleri iletir. Aktivasyon sinyali adaptör protein(ler) üzerindeki “immünoresptörün tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM)” aracılığı ile iletilmektedir. Aktive edici KIR’lar adaptör protein olarak hücre zarına bağlı homodimerik DNAX aktive edici protein 12 kDa (DAP12, DNAX activating protein of 12 kDa) molekülünü kullanır. DAP12 – KIR etkileşimi, KIR molekülünün hücre zarı ile temas bölgesindeki (transmembran bölge – TM) pozitif yüklü amino asit (a.a.) sayesinde olmaktadır. Kovalan olmayan bağlar aracılığı ile bağlanan DAP12, üzerindeki ITAM sayesinde Syk tirozin kinazlar ve zeta (ζ) eşlikçi 70kD protein (ZAP70) sinyal yollarını aktive eder ve hücrenin sitolitik aktivitesi artar. Hücre yüzeyinde inhibitör ve aktivatör KIR molekülleri birlikte eksprese olmaktadır. Her iki reseptörün de sinyal aldığı durumlarda inhibitör sinyallerin aktive edici sinyallere baskın olduğu görülmüştür (Vilches ve Parham 2002; Natarajan ve ark. 2002).

**Tablo 2-1: KIR moleküllerinin yapısal özellikleri ve bilinen ligandları - Vilches ve Parham (2002)'den değiştirilerek.**

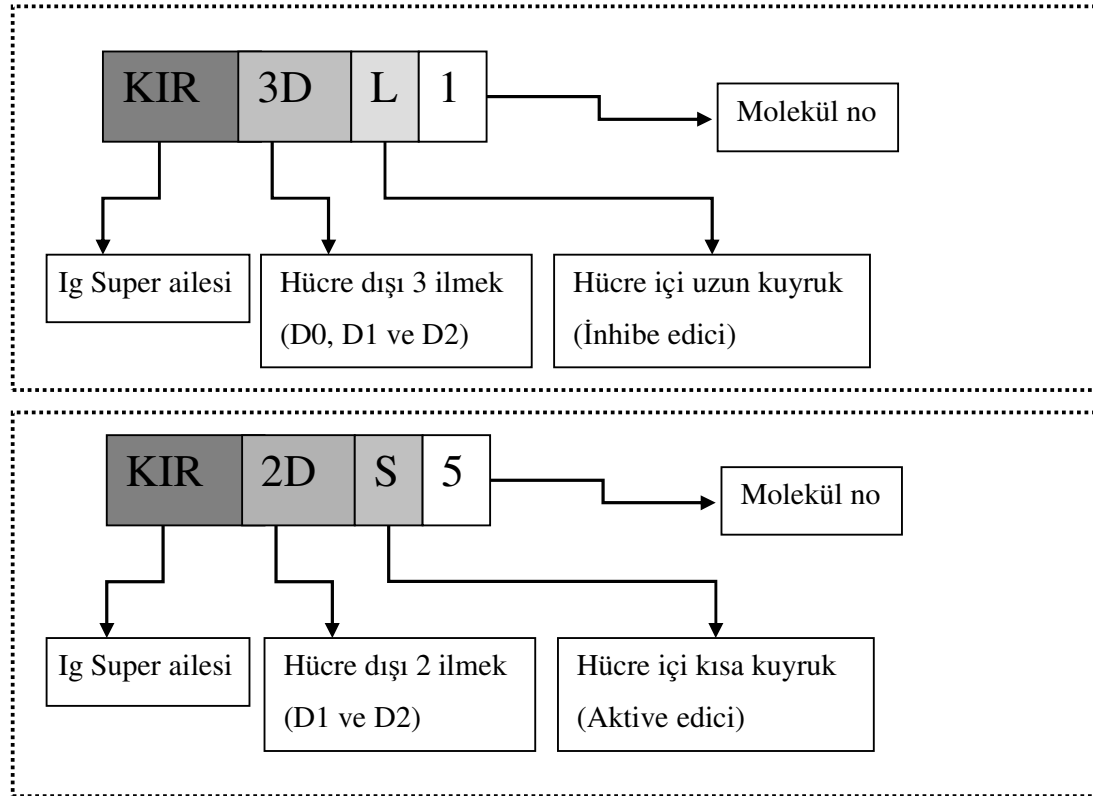
<b>KIR</b>	<b>Hücre dışı Ig ilmeği</b>	<b>TM kısımdaki yüklü amino asit</b>	<b>Hücre içi amino asit ve ITIM dizisi sayısı</b>	<b>Bilinen ligandı</b>
3DL1	D0-D1-D2	-	84; 2	<i>HLA-Bw4</i>
3DL2	D0-D1-D2	-	95; 2	<i>HLA-A3</i>
3DL3	D0-D1-D2	-	95; 2	?
3DS1	D0-D1-D2	Lys	22,27; 0	?
2DL1	D1-D2	-	84; 2	<i>HLA-C<sup>Lys80</sup></i>
2DL2,3	D1-D2	-	84,76; 2	<i>HLA-C<sup>Asn80</sup></i>
2DS1	D1-D2	Lys	39; 0	<i>HLA-C<sup>Lys80</sup></i>
2DS2	D1-D2	Lys	39; 0	<i>HLA-C<sup>Asn80</sup></i>
2DS3,5	D1-D2	Lys	39; 0	?
2DS4	D1-D2	Lys	39; 0	<i>HLA-C ?</i>
2DL4	D0-D2	Arg	115; 1 / 11;0	<i>HLA-G</i>
2DL5	D0-D2	-	115; 2	?

KIR genleri değişik şekillerde çeşitlilik gösterebilmektedir. Birbirleri ile homoloji gösteren bu genlerin dizileri arasındaki fark %2'den fazla olduğunda, moleküller numara serileri ile birbirinden ayrılmaktadır. Bu özelliklere göre KIR proteinleri 13 grupta sınıflandırılmaktadır: KIR2DL 1-5, KIR2DS 1-5, KIR3DL 1-2 ve KIR3DS1 (Tablo 2-1). Bu özelliklere göre yapılan isimlendirmeye örnek Şekil 2-1'de verilmiştir. Aradaki farkın %2'den az olduğu dizilere ait moleküller birbirinin aleli olarak tanımlanmaktadır (Vilches ve Parham 2002). Alellerin kodlanan protein dizileri arasında fark vardır. Aleller birbirinden üç basamaklı numaralar ile ayrılmaktadır. Bu numaralar HLA sistemindeki gibi “ \* ” işareti ile ayrılmaktadır. Kodlanan proteinin dizisinde farklılık yaratmayan DNA süstitüsyonları takip eden iki basamaklı sayılar ile ifade edilmektedir (Örnek: KIR3DL1\*01502 aleli). Gerektiğinde DNA'nın kodlanmayan bölgelerindeki (promotor, intron gibi) süstitüsyonlar da ilave iki basamakla temsil edilmektedir. KIR genlerine ait çok sayıda alel tayin edilmiştir. Alel sayıları her geçen gün artmaktadır (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles.html>). Tablo 2-2'de Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü'nün resmi internet sitesinde yayınlanan ve Ocak 2008 itibari ile kabul görmüş alel sayıları görülmektedir.

**Tablo 2-2: KIR alel sayıları - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>' den alınmıştır.**

Gen	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Alel Sayısı	15	5	7	26	21	12	10	7
Gen	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Alel Sayısı	11	10	49	14	38	55	5	7

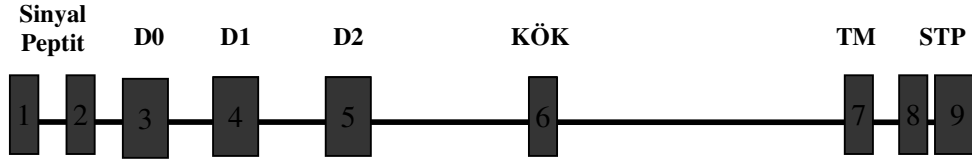
Bu sistemin dışında bir de CD isimlendirme sistemi kullanılmaktadır. KIR molekülleri “CD158” olarak tanımlanmıştır. Alt gruplar harfler ile ifade edilmektedir (CD158e1/e2 = KIR3DL1 gibi). Ancak bu sistem yapısal ve fonksiyonel farklar göstermediği için aynı molekülün pek çok aleline birden bağlanabilen monoklonal antikorların isimlendirilmesinde kullanılmaktadır.



**Şekil 2-1: KIR moleküllerinin isimlendirilmesi**

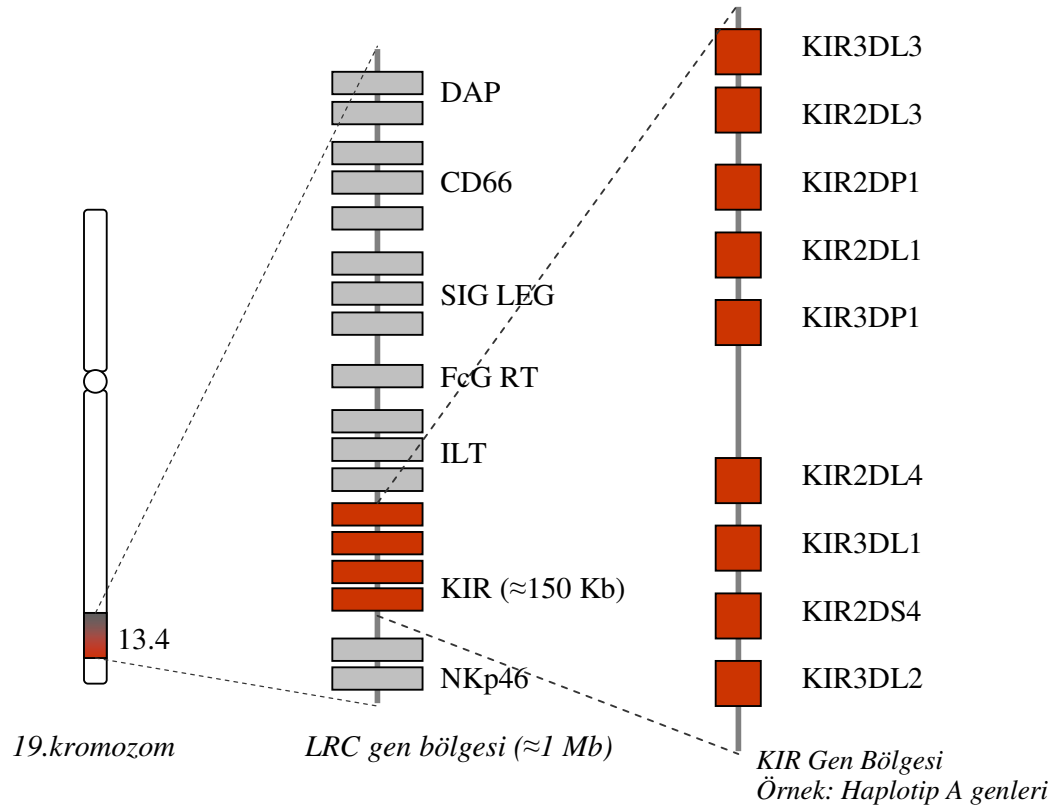
### 2.2.2. KIR Gen Düzeni ve Haplotipik Çeşitliliği

KIR gen lokusu yaklaşık 150 kb büyüklüğündedir, kromozom 19q13.4 bölgesindeki Lökosit Reseptör Kompleksi (LRC) içine yerleşmiştir. Bu bölge içerisinde hem genetik hem de fonksiyonel olarak ilişkili başka genler de bulunmaktadır (Şekil 2-3). KIR molekülleri, aralarında yaklaşık 14-16 kb büyüklüğünde boşluklar bulunan ayrı genler tarafından kodlanmaktadır. Genler dokuz ekson ile organize olmuşlardır. Ekson 1 ve 2'de sinyal peptit ve olgun proteinin ilk iki aminoasidi kodlanmaktadır. Ekson 3, 4, 5'in her birinde sırasıyla D0, D1, D2 olarak adlandırılan Ig benzeri ilmek kodlanır. Ekson 6'da D2 ilmeğini TM kısma bağlayan, kök veya bağlayıcı olarak tanımlanan kısım kodlanmaktadır. Ekson 7'de TM kısım, en son iki eksonda da (ekson 8 ve 9) sitoplazmik kuyruk kodlanır. Şekil 2-2'de KIR3DL1 geninin organizasyonu verilmiştir. Şekildeki her bir siyah kutucuk eksonu, kutucuklar arasındaki çizgiler intronları temsil etmektedir. Kutucuklar yaklaşık ekson uzaklıkları gözetilerek yerleştirilmiştir (Vilches ve Parham 2002).



Şekil 2-2: KIR geninin organizasyonu- Vilches ve Parham (2002)'den değiştirilerek.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda KIR gen lokusunda çok sayıda poligenik ve multi-alelik polimorfizm olduğu saptanmıştır. Gen bölgesinin içeriği haplotipik farklılıklar da göstermektedir. Bunların sonucunda gelişigüzel seçilmiş iki kişinin aynı KIR genotipine sahip olması ihtimali çok düşüktür. Üstelik KIR genlerinin hücreler üzerinde klonal ekspresyonu olması sistemin karmaşıklığına ilave katkı sağlamaktadır.

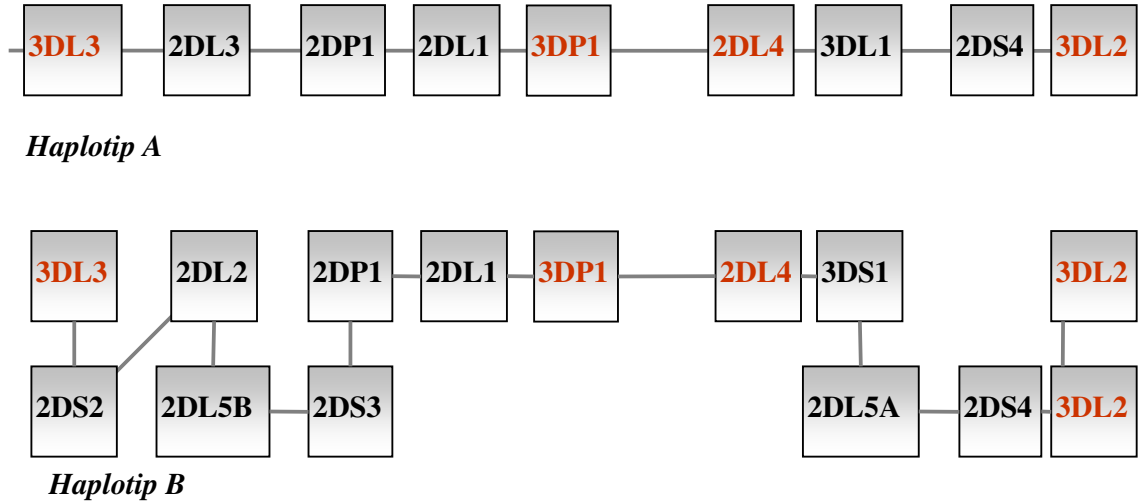


**Şekil 2-3: KIR genlerinin 19.kromozom üzerindeki ve LRC içindeki yerleşimi - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>'den değiştirilerek alınmıştır.**

KIR genleri arka arkaya dizilmiş, dizileri birbirine oldukça (yaklaşık %85-99) benzeyen genlerden oluşmaktadır. KIR haplotiplerinin incelenmesi sonucunda, bu gen bölgesinde zaman içinde gen duplikasyonlarının meydana geldiği ve eşit olmayan “crossing-over” olaylarının olduğu öngörülmektedir. Yani KIR genleri birçok defa genişleyip kısalan bir DNA segmentinin içinde bulunmaktadır (Carrington ve Norman 2003). Bu özellik *KIR* haplotiplerinin poligenik yapısına katkıda bulunmaktadır. Bu tipte moleküler genetik olayların bir sonucu olarak haplotip içerisinde bir genden iki veya daha fazla sayıda kopya bulunması mümkün olabilmektedir (Martin ve ark. 2003).

KIR genlerinin kromozom üzerindeki düzeni başlıca iki haplotip üzerinde toplanabilmektedir: Haplotip A ve Haplotip B. Haplotip A ve B arasındaki en belirgin fonksiyonel fark, içerdikleri aktive edici genlerin sayısıdır. Haplotiplerde çok sayıda ve çeşitte gen bulunmasına rağmen; 2DL4, 3DL2 ve 3DL3 genleri neredeyse bütün haplotiplerde bulunmaktadır. Bu nedenle bu genler çatı bölgeleri (framework loci)

olarak isimlendirilmektedir. Diğer genler bazı haplotiplerde yer almakta, bazılarında yer almamaktadır. Bir haplotip içerisinde bulunabilecek KIR gen sayısı 7-12 arasında değişmektedir. Gen sayısındaki bu değişiklik daha çok aktive edici genlerin varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Haplotip A' da en çok 7 lokus bulunmaktadır: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 ve 3DL3. Bu genlerin hepsi haplotip B içerisinde de görülebilmektedir. Bu genlere ilaveten sadece haplotip B' de görülen genler 2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 olarak sıralanabilir (Uhrberg ve ark. 1997; Parham 2005).



*Kırmızı ile yazılı genler değişmeyen çatı bölgelerini temsil etmektedir.*

**Şekil 2-4: KIR haplotiplerini oluşturan gen içerikleri - Parham (2005)'den değiştirilerek.**

Her iki haplotip incelenen bütün insan popülasyonlarında belirlenmiştir. Ama etnik gruplar içerisindeki görülme sıklıkları arasında fark vardır. Haplotip A ve B'nin beyaz ırk içerisindeki sıklığı (dağılımı) yaklaşık olarak birbirine eşittir. Haplotip A içerisindeki farklılıklar daha çok alelik polimorfizmlerden kaynaklanmaktadır. Haplotip B'de ise hem polimorfik hem de poligenik farklılıklar görülmektedir. Bu nedenle haplotip B daha fazla sayıda alt grup çeşitliliği göstermektedir (Norman ve ark. 2001; Uhrberg ve ark. 2002). Farklı toplumlarda, birbirine akraba olmayan kişilerde yapılan çalışmalarda farklı gen içeriklere sahip 100'den fazla KIR profili tanımlanmıştır (Niokou ve ark. 2003, Bontadini ve ark. 2006; Velickovic 2006). Genel olarak bütün

kişilerde KIR genleri açısından HLA-C için inhibitör reseptör, HLA-G için aktivatör reseptör bulunmaktadır. Bireylerin çoğunluğunda HLA-B alt gruplarına da yönelik inhibitör reseptörler bulunmaktadır.

Her NK hücresi genomda bulunan tüm KIR genlerini eksprese etmez. KIR genlerinin NK hücreleri üzerindeki ekspresyonu, stokastik yani raslantısal bir işlem ile olmaktadır. Bu raslantısal mekanizma henüz tam olarak açığa kavuşturulmamıştır (Parham 2005). KIR genlerinin NK hücreleri üzerinde, alt kümeler halinde eksprese olması DNA metilasyonu ile sabitlenir. Yani NK klonları bölündüklerinde, aynı klondan türetilen yeni hücrelerde de aynı KIR genleri eksprese olmaktadır (Santourlidis ve ark. 2002).

### 2.2.3. KIR Moleküllerinin Ligand Özgüllüğü

Genel olarak söylenecek olursa KIR moleküllerinden KIR3D reseptörleri HLA-A ve -B alellerini, KIR2D reseptörleri ise HLA-C alellerini tanımaktadır (Tablo 2-1). KIR molekülleri ve onların HLA ligandları arasındaki ilişkiler pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Direkt bağlanma çalışmalarına yönelik KIR'ların rekombinant çözünebilir (soluble) formları geliştirilmiş, bu çalışmalarda daha çok KIR2D/HLA-C etkileşimi incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ne reseptör üzerindeki ne de ligand üzerindeki karbonhidrat kalıntılarının özgül bağlanma için gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır (Döhning ve Colonna 1996; Fan ve ark. 1996; Gumperz ve ark. 1995).

HLA-C molekülünün, ağır zincirindeki  $\alpha 1$  heliksinde, 80. pozisyonda iki farklı aminoasit (Lizin-Lys veya Asparjin-Asn) bulunabilmektedir. KIR2DL1, HLA-C<sup>Lys80</sup> alellerini; KIR2DL2 ve KIR2DL3 ise HLA-C<sup>Asn80</sup> alellerini tanımaktadır. KIR2D ve HLA-C bağlanma çalışmalarında, her iki alt grup için de yüzeydeki diğer reseptörlerin gerekli olmadığı bulunmuştur. Yapılan kinetik çalışmalarda elde edilen eğrilere göre bu reseptörlerin ligandlarına son derece hızlı bağlanıp ayrıldıkları gösterilmiştir. KIR2D/HLA-C kompleksi için bağlanma yarı ömrü 0,5 sn olarak hesaplanmıştır (Natarajan ve ark. 2002).

Aktivatör KIR moleküllerinin ligand spesifitesine ait bilgiler oldukça sınırlıdır. İnhibitör ve aktivatör reseptörlerin hücre dışı ilmeklerindeki aminoasit dizileri yüksek oranda benzemektedir. Bu nedenle benzerlik gösterdiği inhibitör reseptör ile aynı HLA Sınıf I ligandlarını bağladıkları düşünülmektedir.

KIR'ların asıl fonksiyonu hedef hücre üzerindeki HLA Sınıf I moleküllerinin ekspresyonunun normal olup olmadığını belirlemektir. Ancak bu fonksiyon HLA üzerindeki peptitten tamamen bağımsız değildir. HLA üzerinde bulunan nanomerlik peptitlerin 7. ve 8. pozisyonlarının değiştirilmesi, hem bağlanma deneylerinde hem de fonksiyonel deneylerde KIR/HLA bağlanmasını etkilemektedir. Bu pozisyonlar HLA üzerindeki peptidin karboksil ucunda yer almakta,  $\alpha 1$  heliksindeki 80. pozisyon civarına denk düşmektedir (Malnati 1995; Perruzi 1996; Rajagopalan 1997). Ancak HLA Sınıf I üzerindeki peptide özgü bağlanmanın patofizyolojik etkileri henüz açıklığa kavuşmamıştır.

#### **2.2.4. KIR3DL1/DS1 Moleküllerinin Özellikleri**

KIR3DL1, HLA-Bw4 allotipleri için spesifik bir reseptör olarak tanımlanmıştır. Bw4 epitopu, HLA molekülünün oldukça polimorfik olan  $\alpha 1$  heliks ilmeği içinde, 80-83. amino asitler arasında yer almaktadır. Serolojik anti-Bw4 serumu tarafından tanınan bir grup HLA-B aleli bu epitopu taşımaktadır. Daha az sayıdaki bazı HLA-A alellerinde de bu epitop görülmektedir (Gumperz ve ark. 1995).

KIR3DL1 molekülüne ait çok sayıda alel bildirilmiştir (Gardiner ve ark. 2001, Norman ve ark. 2007). Bu polimorfizmle oluşan protein dizisindeki değişiklikler hücre yüzeyinde yüksek/düşük olarak farklı düzeylerde eksprese olmalarına neden olmaktadır. Hatta KIR3DL1 alellerinden birisi olan \*004 hücre yüzeyinde eksprese olmamaktadır (Pando ve ark. 2003). Farklı KIR3DL1 alelleri aynı HLA sınıf I molekülü tarafından uyarıldığında farklı düzeylerde inhibisyon yaratabilmektedir (Yawata ve ark. 2006).

Genetik ve protein dizisi açısından KIR3DS1, KIR3DL1'in kısa sitoplazmik kuyruklu, aktive edici aleli olarak kabul edilmektedir (Uhrberg ve ark. 1997; Wilson ve ark. 2000; Gardiner ve ark. 2001). Bu iki molekülün protein dizileri arasında 6-12 amino asitlik bir fark bulunmaktadır ve bu farklılıklar daha çok Ig benzeri ilmek kıvrımları içerisinde bulunur (Vilches ve Parham 2002). KIR3DS1'in ligandı kesin olarak bilinmemektedir. Hücre dışı yapısındaki benzerlikten ötürü HLA-Bw4 motifini bağlayabileceği öne sürülmektedir. (Martin, Gao ve ark. 2002; Martin, Nelson ve ark. 2002).

Bağlanma çalışmaları KIR3D molekülünde bulunan her üç ilmeğin (D0, D1 ve D2) HLA-B ile etkileşimde gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Rojo ve ark. 1997). Gumperz ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan bir çalışmada Bw4 epitopu taşıyan

HLA-A allotiplerinin, KIR3DL1 eksprese eden NK hücrelerini inhibe etmediği gösterilmiştir. Bu bulgu HLA-B molekülündeki, Bw4 motifi dışı polimorfik noktaların da KIR3DL1'in bağlanmasında önem taşıdığı şeklinde yorumlanmıştır. Ancak bu çalışmada KIR3DL1 molekülüne ait alelik farklılıklar gözetilmemiştir. Thananchai ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada KIR3DL1 ile Bw4 epitopu taşıyan HLA-A ve B moleküllerinin etkileşimi incelenmiş, KIR3DL1 molekülünün alelik varyasyonları arasında, viral peptitle yüklü tetramerlere bağlanma kapasiteleri açısından, fark olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bağlanmanın tetramerler üzerine yüklenen farklı viral peptitlerden etkilendiği de gösterilmiştir.

DX9 ve Z27 klonlarından elde edilen monoklonal antikorlar KIR3DL1 reseptörü için özgüdür. Bu antikorların floresans ile işaretlenen ticari türevleri akım sitometrisinde kullanılabilir. Yüzeyinde KIR3DL1 eksprese eden NK ve T hücreleri bu antikorlar aracılığı ile belirlenebilmektedir. Gumperz ve arkadaşları (1996) 200 kişiden oluşan örnek grubunda DX9 monoklonal antikoru kullanarak, KIR3DL1 reseptörünün NK ve T hücreleri üzerindeki ekspresyon farklılıklarını incelemiştir. DX9 antikorunun, NK ve T hücrelerine bağlanma özellikleri 4 grup altında toplanmıştır: DX9 bağlanmasının yüksek olduğu bireyler, düşük olduğu bireyler, bağlanmanın hiç olmadığı bireyler, hem yüksek hem düşük bağlanmanın olduğu, ikili boyanma paterni gösteren bireyler. Yinelene deneylerde bireylerin boyanma paternleri ve DX9 boyanma miktarları aynı kalmıştır. Yapılan aile çalışmaları, ikiz kardeş karşılaştırmaları bu boyanma farklılıklarının genetik olarak düzenlendiğini ortaya koymuştur. Gardiner ve arkadaşları (2001) tarafından farklı DX9 bağlanma paterni gösteren bireylerde KIR3DL1 gen yapısını incelenmiştir. Bireylerin DX9 bağlanma farklılıkları ile o bireylerin genetik olarak sahip olduğu KIR3DL1 alelleri karşılaştırılmıştır. DX9 antikorunun bağlanma farklılıkları, KIR3DL1 geni alelik polimorfizmleri ile ilişkili bulunmuştur. KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*008 alelleri DX9 ile yüksek bağlanma gösteren aleller, KIR3DL1\*005, \*006, \*007 alelleri düşük bağlanma gösteren aleller olarak belirlenmiştir. Antikoru yüksek ve düşük bağlayan aleller açısından heterozigot olan bireyler ikili boyanma paterni göstermektedir. Ayrıca heterozigot KIR3DL1 alellere sahip kişilerde KIR3DL1 genlerinin, NK hücreleri üzerinde klonal olarak eksprese olduğu gösterilmiştir. Yani bu bireylerde her iki KIR3DL1 alelini de eksprese eden NK hücreleri, alellerden sadece birisini veya diğerini eksprese eden NK hücreleri veya her iki aleli de eksprese etmeyen NK hücreleri bulunmaktadır.

Trundley ve arkadaşları (2007) Z27 klonundan elde edilen monoklonal antikorların KIR3DL1 alellerine ilaveten KIR3DS1 molekülünü de bağlayabildiklerini göstermişlerdir. Ayrıca KIR3DL1/3DS1 heterozigot genotipe sahip bireylerde, sadece KIR3DS1 molekülünü eksprese eden NK klonlarının, her iki reseptörü aynı anda eksprese eden klonlardan daha fazla olduğunu da bildirmişlerdir.

### 2.3. KIR Genleri ve Hastalık İlişkileri

KIR moleküllerinin polimorfik yapıları immün yanıtta farklılık oluşturarak bir seçici üstünlük ya da belirli hastalıklara yatkınlık oluşturabilir. KIR reseptörlerinin sağlıklı toplumdaki farklılıkları çevresel faktörler ya da belirli hastalıklarla karşılaşma ile ilişkili olabilir. KIR reseptörleri NK hücre fonksiyonlarını kontrol etmektedir. NK hücreleri, viral hastalıklarda ve tümör hücrelerine karşı immün cevapta yer alırlar. Bunun yanısıra dendritik hücreler ve T hücreleri ile ilişkiye girerek adaptif immün yanıtın oluşmasına da katkıda bulunurlar (Moretta 2002). Kronik viral enfeksiyonlar, otoimmünite, kanser ve transplantasyon gibi pek çok başlık altındaki hastalıkların patogeneğinde hangi KIR molekülünün veya moleküllerinin rol oynadığı araştırılmaktadır.

#### 2.3.1. KIR ve Patojenler

Viral enfeksiyonlarda ve transformasyonlarda konak hücre yüzeyindeki HLA Sınıf I molekül sayısının azalması veya artması, bu hücrelerin NK hücreleri ya da CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından yok edilmesine neden olur. Bu bağlamda KIR moleküllerinin viral enfeksiyonlardaki rolü pek çok araştırmacı tarafından öncelikli çalışma konusu olmuştur. Gerek yapısal, gerekse HLA üzerindeki peptitle ilişki açısından ortaya çıkan fonksiyonel farklılıklar, KIR molekülleri ile HLA etkileşiminin birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

*İnsan İmmün yetersizlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus - HIV):* HIV, dünyada 40 milyondan fazla insanı etkilemiştir. Virüse maruz kalmış kişilerin çoğunluğu kronik infekte hale gelmektedir. HIV, CD4<sup>+</sup> T hücre sayısının azalmasına ve Edinsel immün yetersizlik sendromuna (Acquired Immunodeficiency Syndrome – AIDS) neden olmaktadır. HIV ile infekte 1000'nin üzerindeki hastada yapılmış KIR ve HLA Sınıf I analizi, KIR3DS1 ve HLA-Bw4 genotipi taşıyan hastalardaki AIDS'e progresyonun, bu KIR-HLA birlikteliğini taşımayan hastalara göre, daha yavaş olduğunu göstermiştir. Sadece KIR3DS1 taşıyan, ama HLA-Bw4 motifi olmayan

kişilerde bu etki saptanmamıştır. Yani HLA-Bw4 motifi olmayan kişilerde KIR3DS1'in koruyucu olmadığı, iki alelin birlikteliği sonucunda sinerjistik etkinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Martin, Gao ve ark. 2002). Zambiya'lı AIDS hastalarında yapılan bir çalışmada Bw4 grubuna dahil olan HLA-B\*57 alelleri ile KIR3DL1'in birlikte bulunmasının AIDS progresyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Lopez-Vazquez, Mina-Blanco ve ark. 2005). Martin ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada da KIR3DL1/3DS1 ve HLA-Bw4 alelleri arasındaki bu koruyucu ilişki KIR3DL1/3DS1 alelleri açısından incelenmiş, KIR3DL1\*004 alelinin AIDS progresyonundan koruyucu olduğu bulunmuştur. KIR3DL1\*004 alelinin hücre yüzeyinde eksprese olmaması nedeni ile bu sonuç yazarlar tarafından şaşırtıcı olarak nitelendirilmiş, bu alelin bilinmeyen hücre içi bir fonksiyonu olabileceği veya KIR3DL1\*004 geni ile bağlantı dengesizliği gösteren başka bir genin koruyucu etkili olabileceği öne sürülmüştür.

*Hepatit C virüsü (HCV):* HCV ile karşılaşmış bireyler ya akut enfeksiyon geçirirler ya da enfeksiyon kronikleşir. Kronik olarak infekte olmuş bireylerin %80'i sonradan karaciğer sirozu, hepatoselüler karsinom gibi ciddi karaciğer hastalıkları geliştirme riski altındadır. HCV ile infekte olmuş hastalarda, virüsün temizlenmesi ve kalıcı olması arasındaki farklılıklar KIR ve HLA birlikteliğine yönelik irdelenmiştir. HCV enfeksiyonu kronikleşen kişilere göre, virüsün temizlendiği kişilerde KIR2DL3 ile HLA-C<sup>Asn80</sup> birlikteliği artmış olarak bulunmuştur. Ancak KIR2DL3/HLA-C<sup>Asn80</sup>'nin HCV enfeksiyonlarındaki koruyucu etkisi her iki molekülünde homozigot olduğu (yani KIR2DL2 ve HLA-C<sup>Lys80</sup> olmadığı) durumlarda gösterilmiştir. KIR2DL2 ve KIR2DL3 aynı lokusun iki alelidir ve her iki alel de popülasyonda yaygın olarak bulunmaktadır. KIR2DL3 koruyucu bir etkiye sahipken, KIR2DL2'nin neden böyle bir etkisinin olmadığı bilinmemektedir (Khakoo ve ark. 2004).

### 2.3.2. KIR, Otoimmünite ve İnflamatuvar Hastalıklar

*Psöriasis:* Sık görülen bir inflamatuvar deri hastalığı olan psöriasis ile HLA-Cw6 arasında ilişki olduğu bilinmektedir. İlişkili olan HLA Sınıf I allotipi HLA-C<sup>Lys80</sup> grubuna dahildir ve KIR2DL1 inhibitör ve KIR2DS1 aktivatör reseptörlerini bağlamaktadır. KIR2DS1 hem tek başına hem de HLA-Cw6 ile birlikte psöriasis gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca psöriasis ile yakından ilişkili olan psöriatik artrit (PsA), HLA-Cw6 hastalığın gelişiminde rol oynayan ilave bir genetik eleman

olarak düşünülmektedir. PsA'lı 366 hastada yapılan çalışmada, inhibitör etkili KIR reseptörü için HLA Sınıf I ligandı olmaması hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Martin, Nelson ve ark. 2002). Bu çalışmanın sonuçları tekrar yorumlanarak, ikinci defa yeniden yayınlanmıştır. İkinci modele göre aktivatör KIR'lara sahip (KIR2DS1 veya KIR2DS2) kişiler bu reseptörlerin ligandları olan HLA-C (Lys80 veya Asn80) açısından homozigot ise, bu kişilerde PsA gelişme olasılığı artmaktadır. 220 psöriasis hastasından oluşan ve 75 (%34.1)'i PsA'lı olan grupta yapılan ilave çalışmada, KIR2DS2 özellikle PsA'lı alt grup ile bağlantılı bulunmuş, sadece deri hastalığı olan psöriatik hastalarda böyle bir ilişki bulunmamıştır (Nelson ve ark. 2004).

*Romatoid artrit:* KIR ile ilişkisi gösterilen diğer bir artropati romatoid artrit (RA)'tir. KIR2DS2 eksprese eden CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T hücrelerinin RA'da arttığı gösterilmiştir. T hücre reseptörü (THR) çeşitliliği sınırlı olan bu hücreler, efektör hafıza hücreleri olarak görev yapar, Th1 sitokinleri salgılar ve sitotoksik etki gösterirler. Bu hücre grubu üzerindeki KIR reseptörlerinin, THR uyarısından bağımsız olarak ligasyonu hücrelerin proliferasyonuna ve sitokin salgılamasına, sitotoksitesinin artmasına neden olmaktadır (Namekawa ve ark. 2000). RA alt gruplarında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda aktive KIR moleküllerinin kronik inflamatuvar koşullarda önemli olduğu ileri sürülmektedir (Khakoo ve Carrington, 2006).

### 2.3.3. KIR ve Behçet Hastalığı

KIR haplotipleri içerisinde pek çok gen bulunmaktadır. KIR3DL1 geni hem haplotip A, hem de haplotip B içinde bulunabilmektedir. KIR3DS1 ise sadece haplotip B'de bulunmaktadır. Middleton ve arkadaşları (2007) tarafından yayınlanan çalışmada Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerde 14 farklı KIR geninin varlığı/yokluğu belirlenmiştir. KIR3DL1 geninin HLA-Bw4 ile birlikteliği sağlıklı kontrollere göre Behçet hastalarında yüksek olarak bildirilmiştir.

Behçet hastalığı ile genetik ilişkisi gösterilen HLA-Bw4 ve B\*51'in KIR3DL1 ile bağlanabilmesi nedeniyle, bu etkileşimin hastalığın gelişiminde fonksiyonel öneme sahip olabileceği öne sürülmektedir. Saruhan-Direskeneli ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerdeki KIR3DL1 ekspresyonu karşılaştırılmıştır. DX9 antikoru kullanılarak akım sitometrisi ile gerçekleştirilen çalışmada T ve NK hücreleri üzerindeki KIR3DL1 ekspresyonları arasında fark bulunmamıştır. Takeno ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada

ise göz tutulumu olan Behçet hastalarında, CD56<sup>+</sup> hücreler üzerindeki KIR3DL1 ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Bazı hastalarda ekspresyon düşüklüğü, bazı hastalarda da ekspresyon artışı olarak saptanan bu farklılıkların NK hücre repertuarından kaynaklanabileceği öne sürülmektedir.

KIR genleri ve KIR3DL1 geni ile Behçet hastalığı ilişkisi incelenmesine rağmen KIR3DL1'in alellik çeşitliliğinden kaynaklanabilecek farklılık irdelenmemiştir. Bu çalışmada Behçet hastalığı ile HLA-Bw4 ve B\*51 arasındaki ilişkinin fonksiyonel bir açılımı olabileceği düşünülerek sadece KIR3DL1/DS1 geninin varlığı ve yokluğu araştırılmış buna ilave olarak alelleri belirlenmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubundaki hastalar İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, Behçet Hastalığı Polikliniği'nde izlenmekte olan hastalar arasından seçilmiştir. Hastaların hepsi Uluslararası Çalışma Grubu'nun Behçet Hastalığı sınıflandırma kriterlerine uygun olarak seçilmiştir (International Study Group for Behcet's Disease, 1990). Çalışmada hasta grubunu yaş ortalaması  $36,3 \pm 9,6$  olan 141 erkek, yaş ortalaması  $38 \pm 10,8$  yıl olan 100 kadın, toplam 241 hasta oluşturmuştur.

Sağlıklı olduğu bilinen ve Behçet hastalığı ile ilgili herhangi bir bulgu öyküsü olmayan 117 erkek (yaş ortalaması  $34,2 \pm 9$  yıl) ve 118 kadın ( $34,6 \pm 9,3$  yıl), toplam 235 gönüllü kontrol grubunu oluşturmuştur.

Bu çalışmanın deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Fizioloji Anabilim Dalı, Nöroimmünoloji ve İmmünojenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. DNA İzolasyonu

Daha önce Gül ve arkadaşlarının (2002) çalışmasında kullanılan 174 Behçet hastası ve 191 sağlıklı kontrol DNA'sı bu çalışmada da kullanılmıştır. Bu DNA'lara ek olarak yeni 44 sağlıklı kontrolün, 67 Behçet hastasının DNA'sı izole edilmiştir. İzolasyon için hastaların ve sağlıklı kontrollerin ön kol venlerinden 5-10 ml venöz kan EDTA'lı tüplere alınmıştır. Santrifüj 3000 rpm'de yapılmış ve lökositlerin bulunduğu faz (buffy coat) pastör pipetleri ile toplanarak temiz bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 10 ml'ye tamamlayacak şekilde eritrosit parçalayıcı tampon ( $0,144M NH_4Cl + 1 mM NaHCO_3$ ) ilave edilmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Santrifüj 3000 rpm'de 10 dakika yapılmış hücre çekirdeklerinin çökmesi sağlanmıştır. Hücre çekirdeklerinden oluşan çökeltiye zarar vermeden üst sıvı atılmış ve tekrar eritrosit parçalayıcı solüsyon eklenerek yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Eritrositlerden arındırılan çökelti üzerine 2,5 mL çekirdek patlatma solüsyonu (10 mM Tris-HCl (pH:7,6), 10 mM EDTA (pH:8), 50 mM NaCl) ilave edilmiştir. Vorteks ile çökelti dağıtılmış ve 100 µl %20'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmiştir. Yine vorteks kullanılarak SDS'in karışması sağlanmıştır. Proteinlerin parçalanması için 100 µl Proteinaz K (2 µg/µl) ilave edilerek

42°C’ deki su banyosunda bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün tüplere 1,5 mL 6 M NaCl çözeltisi ilave edilmiş, çalkalanarak karıştırılmış ve 3000 rpm devirde 30dakika santrifüj edilmiştir. Tuz ile birlikte çöken proteinlerden oluşan çökeltiye dokunulmadan üstte kalan sıvı faz, pastör pipeti ile temiz bir tüpe aktarılmış, üzerine 1 sıvı / 3 alkol oranında mutlak etanol eklenmiş ve hafif çalkalamalar ile DNA’nın görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Beyaz bir köpük şeklinde oluşan DNA pipet ucu ile alınarak steril tüpe aktarılmıştır. Alkolün uçması beklendikten sonra elde edilen DNA 200 µl steril su içinde çözülmüştür. Bir miktar DNA 1:50 oranında sulandırılmış, miktar ve protein oranı tayini için optik yoğunluk (OD) değerleri spektrofotometrede okunmuştur. DNA miktar tayini için 260 nm’de ve protein oranının belirlenmesi için 280 nm’de suya karşı ölçüm yapılmıştır. DNA, 260 nm OD değeri esas alınarak 30 µg/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Sulandırılan DNA’lar çalışılıncaya kadar +4°C’ de saklanmıştır.

### **3.3. KIR Gen İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem**

KIR3DL1/DS1 gen içeriği yani varlığı ve yokluğu PCR-SSP yöntemi ile belirlenmiştir. Deneylerde Martin, Gao ve arkadaşları (2002) tarafından tanımlanan iki farklı primer çifti kullanılmıştır (Tablo 3-1). Primer çiftleri için ayrı deney koşulları oluşturulmuş, birbirini doğrulayan sonuçlar değerlendirilmeye alınmıştır. Son hacim 20 µl olacak şekilde PCR tamponu, 2 – 2,5 µM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,5 U Taq polimeraz, 0,5 µM özgül primer, 0,2 mM kontrol primeri ve 30 µg/ml genomik DNA kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan kontrol primerleri DRB1 geninin üçüncü intronuna ait 796 bp’lik bir parçayı hedeflemiştir. KIR3DS1 için PCR işlemi 95°C’de 2 dakika denatürasyon sonrası 95°C’de 45 saniye, miks 1 için 59°C’de ve miks 2 için 63°C’de 45 saniye, 72°C’de 45 saniye olarak 35 döngü gerçekleştirilmiş, 72°C’de 2 dakika son uzatma basamağı ile tamamlanmıştır. KIR3DL1 için ise daha önce Martin, Gao ve arkadaşları (2002) tarafından tanımlanan üç aşamalı PCR programı kullanılmıştır. Denatürasyon işlemi 96°C’de 1 dakika olarak yapıldıktan sonra ilk aşamada 96°C’de 25 saniye, 65°C’de 45 saniye, 72°C’de 30 saniye 5 döngü; ikinci aşamada 96°C’de 25 saniye, 60°C’de 45 saniye, 72°C’de 30 saniye 21 döngü; son aşamada 96°C’de 25 saniye, 55°C’de 1 dakika, 72°C’de 2 dakika olacak şekilde 5 döngü yapılmış, PCR işlemi 72°C’de 10 dakika son uzatma basamağı ile tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, etidyum bromür (EtBr) ile işaretli %2’lik agaroz jele yüklenerek, elektroforez

tanklarında 50 mA, 150 kV akım altında 15 dakika yürütülerek, ultraviyole transillüminatörü ile görüntülenmiştir.

**Tablo 3-1: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizisi**

	Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')
KIR3DL1	1F primer	CGCTGTGGTGCCTCGA
	1R primer	GGTGTGAACCCCGACATG
	2F primer	CCCTGGTCAAATCAGGAGAGAG
	2R primer	TGTAGGTCCCTGCAAGGGCAA
KIR3DS1	1F primer	AGCCTGCAGGGAACAGAAG
	1R primer	GCCTGACTGTGGTGCTCG
	2F primer	CCTGGTCAAATCAGGAGAGAG
	2R primer	GTCCCTGCAAGGGCAC

### 3.4. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem

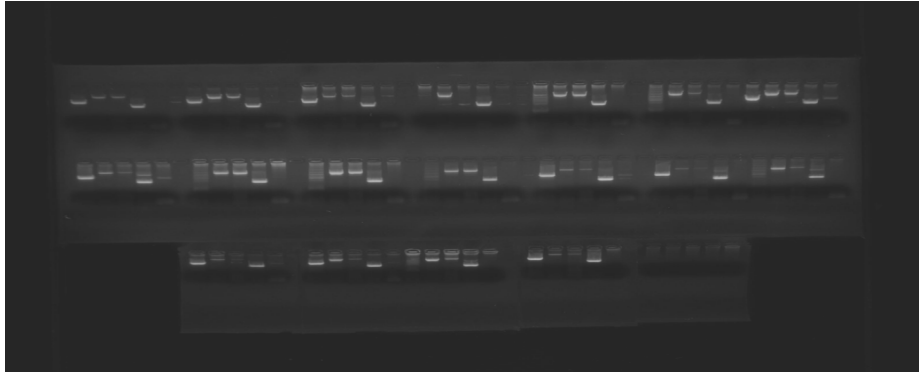
KIR3DL1/DS1 genine ait aleller çalışma grubumuz dahilindeki 216 Behçet hastası, 215 sağlıklı kontrolde PCR-SSP ile belirlenmiştir. Tablo 3-2'de verilen KIR3DL1/DS1 alel primer dizileri 9 aleli gösterebilecek ayrıştırma düzeyinde Paul Norman ile birlikte seçilmiştir. Seçilen 18 primer kullanılarak alellerin tanımlanmasında kullanılacak 12 farklı primer çifti oluşturulmuştur (Tablo 3-3).

**Tablo 3-2: KIR3DL1/DS1 Alellerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizisi**

Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')	Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')
nkb1f	AGAGGGCCGGTCCACACG	nkat3r	TTGCCCTGCAGGGACCTA
g160f	ACTCTTCGGTGTCACTATCG	conc613r	CCCTATCAGTTGTCAGCTC
nkat3f	TACAAAGAAGACAGAATCCACA	t613r	TCCTATCAGTTGTCAGCTCC
t552f	CCAAGGCCAATTTCTCCATT	c738r	CAGCTCCCGGAGCTCCTA
cg1028f	ACCCAGACACCTGCACG	c781r	CGGGGAGCCCATGAACGT
ca1028f	AACCCAGACACCTGCACA	cc1154r	CCAACAGCGAGGTAGGTG
t10f	TGCACCGGCAGCACCATGT	c128r	CGGAGGACACGTGACTCTT
a160r	ATCATAGGTTAACAATTCATG	uh3dl1f	CCATCGGTCCCATGATGCT
nkb1r	TTATTCCAGGAGAGCTTCAAC	uh3dl1r	AGAGAGAAGGTTTCTCATATG

Yapılan ön denemelerde 12 ayrı reaksiyonu aynı anda çalıştırabilecek optimum deney koşulları oluşturulmaya çalışılmıştır. Gerek termal döngü cihazındaki PCR programında gerekse PCR koşullarında yapılan çok sayıdaki denemelerde 12 farklı reaksiyonu aynı anda çalıştırabilecek ortak bir koşul bulunamamıştır. Sonuçta PCR koşulları sabit tutulmuş, primer miksleri termal döngü cihazı programında düşük yapışma derecesinde reaksiyon veren karışımlar ve yüksek yapışma derecesinde reaksiyon veren karışımlar olarak iki gruba toplanmıştır. Primer karışımlarının reaksiyon verdiği yapışma dereceleri Tablo 3-3’de verilmiştir.

PCR işlemi, son hacim 15 µL olacak şekilde, amonyum (NH<sub>4</sub>) tamponu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,625 U Taq polimeraz, 0,5 µM primer karışımı kullanılarak yapılmıştır. Ortalama 75-150 ng genomik DNA içeren örneklerle iki aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk aşama 95°C’de 5 dakika denatürasyon sonrasında, 5 döngü 97°C’de 20 saniye, optimum yapışma (annealing) derecesinde 45 saniye ve 72°C’de 90 saniye olarak yapılmış, ikinci aşamada 30 döngü 95°C’de 20 saniye, optimum yapışma derecesinde 45 saniye ve 72°C’de 90 saniye tutulduktan sonra, 72°C’de 7 dakika son uzatma basamağı ile tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, EtBr ile işaretli %1,5’lik agaroz jelle yüklenerek, elektroforez tanklarında 100 mA, 150 kV akım altında 30 dakika yürütülerek, ultraviyole transillüminatörü ile görüntülenmiştir. Deneylere ait jel görüntüleri dijital olarak fotoğraflanarak saklanmıştır. Her bir DNA için hedeflenen KIR3DL1 gen bölgelerinin çoğalıp çoğalmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 3-1). Çoğalmanın olduğu ve olmadığı primer karışımları değerlendirilerek aleller belirlenmiştir. Değerlendirmede kullanılan şablon Tablo 3-3’de verilmiştir.



**Şekil 3-1: KIR3DL1 alelleri değerlendirilirken kullanılan agaroz jel fotoğrafı örneği**

### 3.4.1. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Şablon Kullanılarak Değerlendirilmesi

Şablon kullanılırken siyah kutucuklardan yararlanılmıştır. Her bir alelin yazdığı sütunda bulunan siyah kutucuklar, o alel için çalışması gerekli olan mikslere yani primer karışımlarını göstermektedir (Tablo 3-3). Örneğin KIR3DL1\*001 alelinin belirlenebilmesi için miks 2, miks 3 ve miks 6 ile yapılan PCR deneylerinden pozitif sonuç alınması gerekmektedir.

**Tablo 3-3: KIR3DL1 alelleri için kullanılan primer karışımları, çoğaltılan ürünlerin büyüklükleri, PCR programı yapışma dereceleri ve alellere göre değerlendirme şablonu**

Miks No	Primer f	Primer r	Ürün (bp)	Yapışma sıcaklığı (°C)	KIR3DL1 ALELLERİ									
					*001	*002	*01502	*004	*005	*006	*007	*008	*013	
1	nkb1f	nkb1r	960	63,3-58,6		■	■			■	■			
2	nkat3f	nkat3r	1560	63,3-58,6	■			■	■					
3	nkat3f	conc613r	1600	63,3-58,6	■									
4	c1032f	cc1154r	650	68-60				■						
5	cg1028f	cc1154r	650	68-60							■			
6	ca1028f	cc1154r	650	63,3-58,6	■	■	■		■	■		■		
7	3dl1f	c781r	2000	68-60		■								
8	3dl1f	c738r	1900	68-60		■	■							
9	g160f	t613r	1600	68-60					■					
10	t552f	3dl1r	1700	68-60						■				
11	nkb1f	a160r	900	63,3-58,6								■		
12	t10f	C128r	1900	68-60										■

### 3.5. HLA-B Tiplendirilmesi

Bu çalışmada kullanılan 173 sağlıklı kontrolün ve 171 Behçet hastasının HLA-B verileri daha önce Gül A ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmadan sağlanmıştır. Çalışma grubundan kalan 62 sağlıklı kontrol ve 70 Behçet hastasının HLA-B verileri Bunce ve ark.(1995) tarafından tanımlanan PCR-SSP yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında kullanılan primerlerin dizileri ve bu primerlerin hedef lokusları ve nükleik asit pozisyonları Tablo 3-4'de verilmiştir (Bunce ve ark, 1995).

**Tablo 3-4: HLA-B tiplendirmesinde kullanılan primerlerin dizileri**

Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')	Hedef Lokus ve Pozisyon
193	GGAGTATTGGGACCGGAAC	HLA-A ve B, Ekson 2 ( 170-188)
208	ACCGAGAGAACCTGCGGAT	HLA-A ve B, Ekson 2 ( 220-238)
216	CGTTCAGGGCGATGTAATCT	HLA-B, Ekson 3 ( 92-111)
235	GCCCACTTCTGGAAGTTCT	HLA-B, Ekson 4 (168-187)
251	GGACCTGCGGACCCTGCT	HLA-B, Ekson 2 (244-227)
278	GAGCCTGCGGACCCTGCT	HLA-B, Ekson 2 (227-244)
435	CCTGCGCACCGCGCTCC	HLA-B, Ekson 2 (230-246)

Bu primerler kullanılarak oluşturulan karışımlar, çoğaltılan ürünlerin büyüklükleri ve pozitif sonuçları değerlendirme şablonu Tablo 3-5'de verilmiştir. Sonuçlara göre çalışılan bireyin HLA-Bw4 taşıyıp taşımadığı, Bw4 80. pozisyonun İzolösün (I80) olup olmadığı, HLA-B\*51'e sahip olup olmadığı belirlenmiştir. Pozitif sonuç vermesi gereken miks kutucukları gri olarak işaretlenmiştir (Tablo 3-5). Örneğin sadece miks 1 pozitif, miks 2 ve 3 negatif sonuç verdiğinde sonuç HLA-Bw4 pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bw4 pozitif grup içerisindeki HLA-B allotipleri B\*5, B\*51, B\*13, B\*17, B\*27, B\*37, B\*38, B\*44, B\*47, B\*49, B\*53, B\*57, B\*58, B\*59, B\*63, B\*77 olarak sıralanabilir ([www.anthonynolan.org.uk/HIG](http://www.anthonynolan.org.uk/HIG)). Miks 1 ve 2 pozitif, miks 3 negatif sonuç verdiğinde HLA-Bw4-I80 pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hepsisi (Miks 1, 2 ve 3) pozitif sonuç verdiğinde HLA-B\*51 pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 3-5: HLA-B primerleri ile oluşturulan primer karışımları, çoğaltılan ürün büyüklükleri, sonuçları değerlendirme şablonu**

Miks No	Primer f	Primer r	Ürün (bp)	Bw4	Bw4I80	B*51
1	208, 251, 278, 435	235	1330			
2	208	235	1330			
3	193	216	451			

HLA-B tiplendirmesi için PCR işlemi, son hacim 15 µl olacak şekilde, amonyum (NH<sub>4</sub>) tamponu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,125 mM dNTP karışımı, 1U Taq polimeraz, 0,8 µM primer karışımı kullanılarak yapılmıştır. Ortalama 75-150 ng genomik DNA içeren örneklerle 3 aşamalı PCR işlemi yapılmıştır. PCR işleminin ilk

aşaması 96°C’de 1 dakika denatürasyon sonrasında, 5 döngü 96°C’de 25 saniye, 70°C’de 45 saniye ve 72°C’de 45 saniye ile gerçekleştirilmiş, ikinci aşaması 21 döngü 96°C’de 25 saniye, 65°C’de 50 saniye ve 72°C’de 45 saniye olarak yapılmış, son aşaması da 4 döngü 96°C’de 25 saniye, 55°C’de 1 dakika, 72°C’de 2 dakika ile tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, EtBr ile işaretli %1,5’lik agaroz jele yüklenerek, elektroforez tanklarında 50 mA ve 150 kV akım altında 15 dakika yürütülmüştür. Sonuçlar ultraviyole transillüminatörü ile görüntülenmiştir.

### 3.6. Deneysel Aşamalarda Kullanılan Malzeme ve Cihazların Listesi

Deneysel aşamalar İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroimmünoloji ve İmmünogenetik Laboratuvarı bünyesinde bulunan cihaz ve ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-6).

**Tablo 3-6: Deneysel aşamalarda kullanılan malzeme ve cihazların listesi**

Malzeme	Marka
Taq Polimeraz	Fermentas (Katalog No #EP0402)
10xNH <sub>4</sub> PCR Tamponu	Fermentas (Katalog No #B33)
dNTP	Fermentas (Katalog No #R0182)
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas (Katalog No #R0971)
KIR3DL1/DS1 Primerleri	Bio Basic Inc.
HLA-B Primerleri	Integrated DNA Technologies (IDT)
KIR3DL1/DS1 Alel Primerleri	Integrated DNA Technologies (IDT)
Agaroz	Sigma (Katalog No #A9539)
Cihaz	Marka
Termal döngü cihazı	Biometra, T-Gradient
Elektroforez Jel Sistemi	EC Apparatus Corporation, Minicell-Maxicell
Güç Kaynağı	LKB Biochrom, 2103 Power Supply
Ultraviyole Görüntüleme	UVP, UV Transilluminator
Görüntüleme Analizi	Biometra, BDA Digital

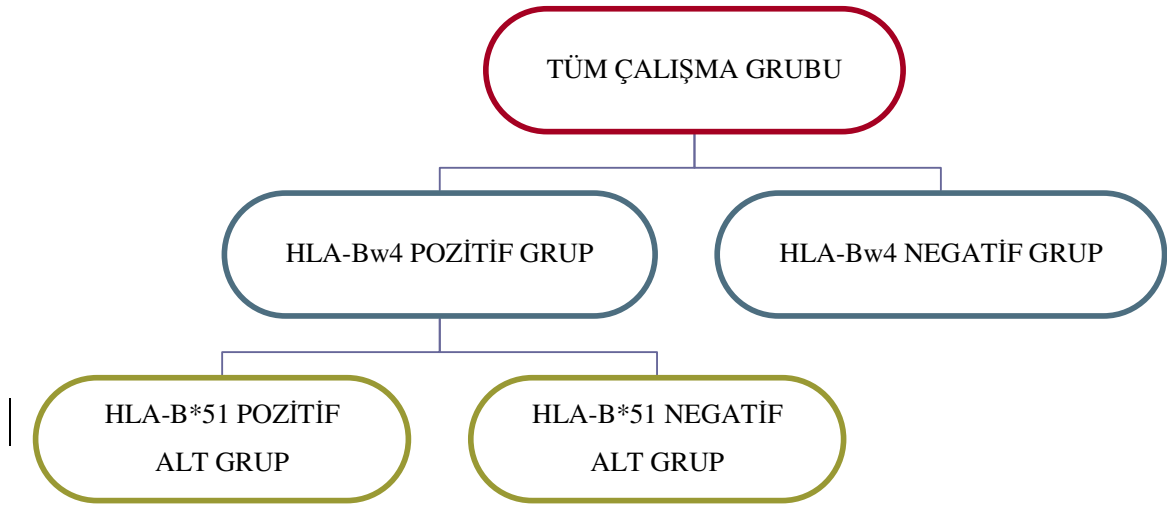
### 3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Hasta ve sağlıklı kontrollerde saptanan alel sıklıkları  $\chi^2$  testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı olan sonuçlar için risk oranları (Odds Ratio-OR) ve bu değerlerin %95 güven aralıkları (%95 GA) belirlenmiştir. Bu tez çalışmasındaki P değerleri düzeltilme yapılmadan verilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin Değerlendirilmesi

Gen ve protein dizisindeki benzerlikten ötürü KIR3DS1, KIR3DL1'in bir alelli olarak kabul edilmektedir. KIR3DL1/DS1 gen içeriğine ait genotip sıklıkları 241 Behçet hastası, 235 sağlıklı kontrolde belirlenmiştir. KIR3DL1 molekülü Bw4 epitopunu taşıyan HLA-B alellere bağlandığı için, çalışma grubunda HLA-Bw4 ve HLA-B\*51 özelliklerine göre alt gruplar oluşturulmuş, değerlendirilmeler ayrıca bu alt gruplarda yapılmıştır. Şekil 4-1'de verilen diagramda alt grup sistematığı görülmektedir.



Şekil 4-1: Çalışma grubu değerlendirme diagramı

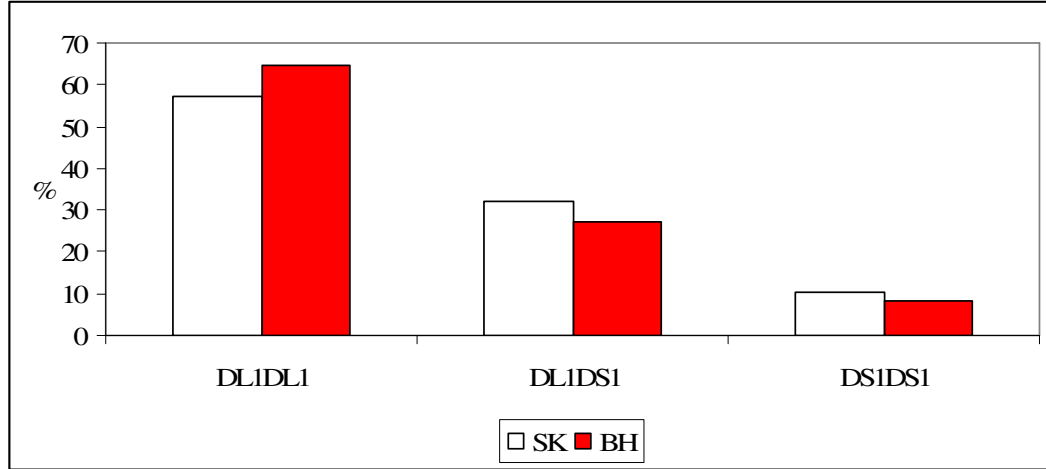
Gül ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada HLA-B\*51 pozitifliği Behçet hastalarında %61, sağlıklı kontrollerde %24 olarak bildirilmiştir. Tablo 4-1'de gösterilen HLA-Bw4 ve B\*51 verilerinin çalışma grubu içerisindeki dağılımı Gül ve arkadaşlarının bu çalışması ile uyumludur.

Tablo 4-1: HLA-B verisinin çalışma grubu içerisindeki dağılımı

HLA-B	SK N=241	%	BH N=235	%	<i>p</i>	OR	%95 GA
HLA-Bw4 +	153	<b>63,8</b>	199	<b>81,1</b>	<0,0001	2,54	1,6-3,9
HLA-B*51 +	55	<b>23,1</b>	150	<b>59,3</b>	<0,0001	4,8	3,1-7,4

#### 4.1.1. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin Tüm alışma Grubundaki Değerlendirilmesi

Tüm alışma grubunun KIR3DL1/DS1 genotip sıklıkları Şekil 4-2’de verilmiştir. KIR3DL1 / KIR3DL1 genotip sıklığı Behçet hastalarında yüksek olarak belirlenmiştir (Behçet hastaları %64,7 ve sağlıklı kontroller %57,4), ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



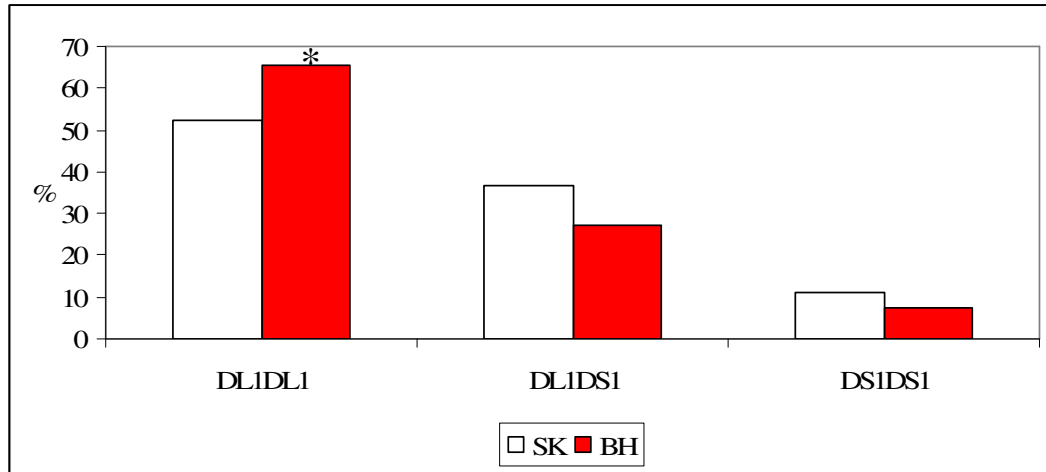
Şekil 4-2: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin tüm çalışma grubundaki dağılımlı (SK: sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)

#### 4.1.2. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin HLA-Bw4 ile Birlikte Değerlendirilmesi

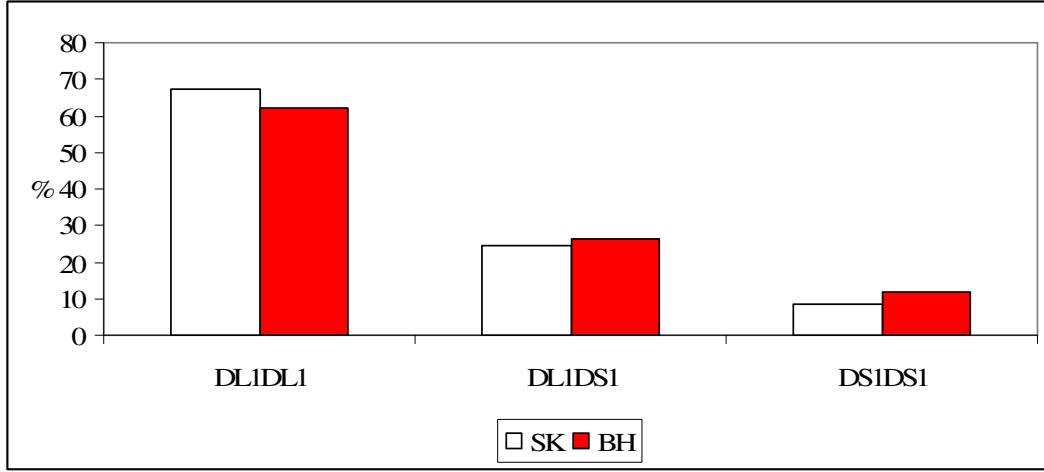
KIR3DL1 molekülü fonksiyonel olarak HLA-Bw4 alellerini tanıdığı için çalışma grubu Bw4-Pozitif (+) ve Bw4-Negatif (-) şeklinde gruplanmıştır (Şekil 4-1). Çalışma grubunda Behçet hastalarının %82,5’i, ve sağlıklı kontrollerin %65,1’i HLA-Bw4 aleli taşımaktadır. HLA-Bw4+ grup KIR3DL1/DS1 genotip dağılımları Tablo 4-3’de verilmiştir. Yapılan değerlendirmede KIR3DL1 / KIR3DL1 genotip sıklığı Behçet hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4-2, Şekil 4-3).

**Tablo 4-2: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif grup içerisindeki dağılımı**

Genotip	SK N=153	%	BH N=199	%	p	OR	%95 GA
KIR3DL1 / KIR3DL1	80	<b>52,3</b>	130	<b>65,3</b>	0,013	1,7	1,1-2,6
KIR3DL1 / KIR3DS1	56	<b>36,6</b>	54	<b>27,1</b>			
KIR3DS1 / KIR3DS1	17	<b>11,1</b>	15	<b>7,5</b>			

**Şekil 4-3: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

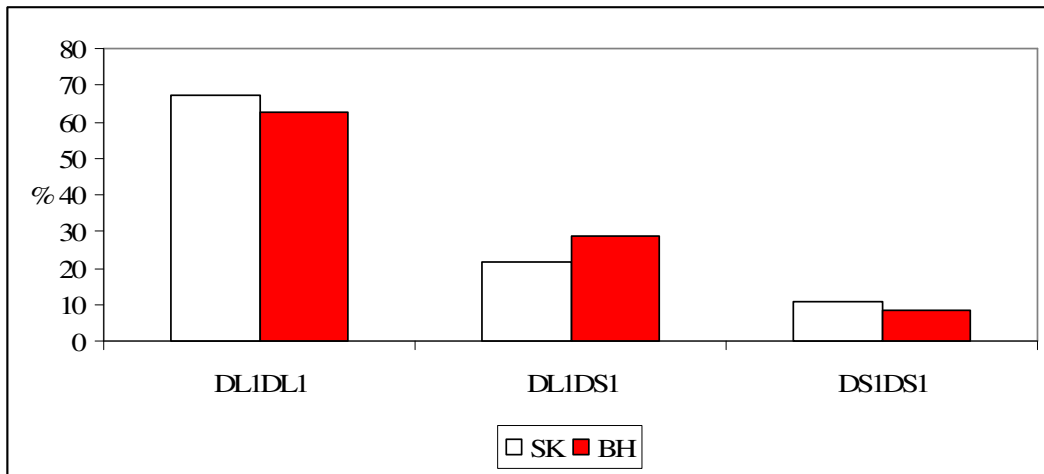
KIR3DL1/DS1 gen içeriği HLA-Bw4 negatif grup dağılımlında Behçet hastaları ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 negatif gruptaki dağılımlı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)

#### 4.1.3. KIR3DL1/DS1 Gen İçeriğinin HLA-B\*51 ile Birlikte Değerlendirilmesi

HLA-B\*51, Bw4 epitopunu taşıtmaktadır. Bw4 pozitif alt grup HLA-B\*51'e göre sınıflandırılmıştır (Şekil4-1). HLA-Bw4 pozitif Behçet hastalarının %75,3'ü, sağlıklı kontrollerin %35,9'u B\*51 pozitifdir. Bu gruptaki KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin dağılımlı anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 4-5).

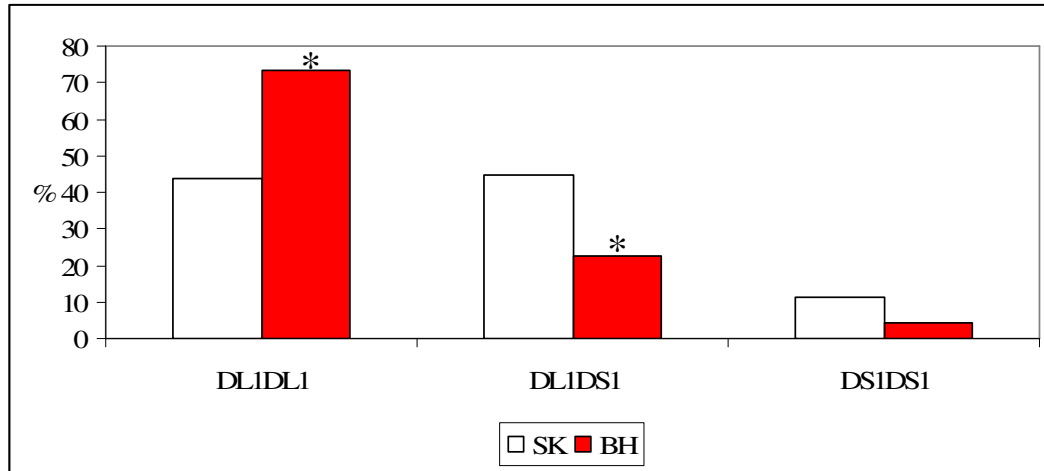


Şekil 4-5: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 pozitif gruptaki dağılımlı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)

HLA-Bw4 pozitif grup içerisindeki B\*51 negatif alt grup ise %24,6 Behçet hastası ve %64 sağlıklı kontrolden oluşmaktadır. Bu grup içerisindeki KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin dağılımı Tablo 4-3'de ve Şekil 4-6'de verilmiştir. KIR3DL1 / KIR3DL1 genotip sıklığı Behçet hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4-3, Şekil 4-6). KIR3DL1 /KIR3DS1 genotip sıklığı ise sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak yüksek belirlenmiştir (Tablo 4-3, Şekil 4-6).

**Tablo 4-3: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 negatif gruptaki dağılımı**

Genotip	SK N=98	%	BH N=49	%	p	OR	%95 GA
KIR3DL1 / KIR3DL1	43	<b>43,9</b>	36	<b>73,5</b>	0,001	3,5	1,6-7,4
KIR3DL1 / KIR3DS1	44	<b>44,9</b>	11	<b>22,4</b>	0,008	0,35	0,1-0,7
KIR3DS1 / KIR3DS1	11	<b>11,2</b>	2	<b>4,1</b>			



**Şekil 4-6: KIR3DL1/DS1 gen içeriğinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 negatif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

## 4.2. KIR3DL1/DS1 Alellerinin Değerlendirilmesi

Çalışmanın bu aşamasında KIR3DL1/DS1 molekülüne ait KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*006, \*007, \*008 ve KIR3DS1\*013 alellerinin dağılımı 216 Behçet hastası ve 215 sağlıklı kontrolde belirlenmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Çalışma grubunda KIR3DL1\*006 aleli hiç saptanmamıştır, bu nedenle alel değerlendirmelerin yapıldığı tablo ve grafiklere dahil edilmemiştir.

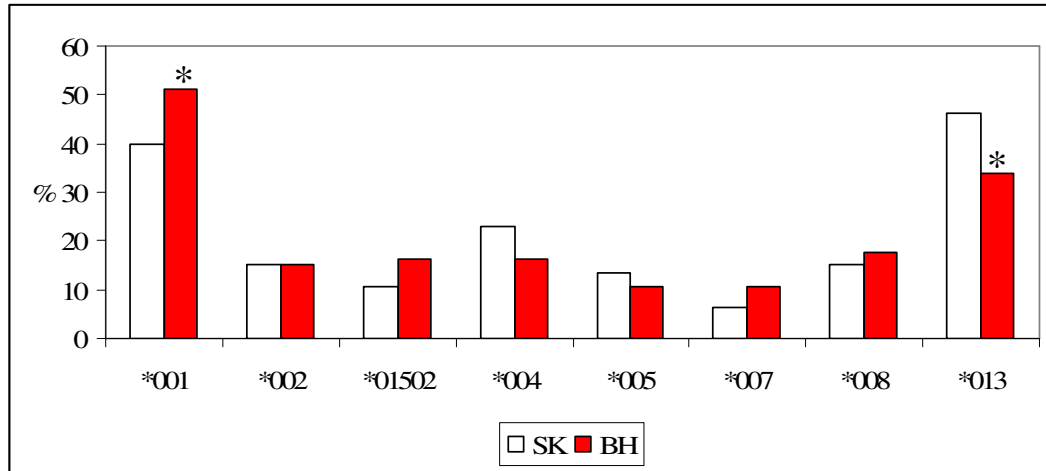
### 4.2.1. KIR3DL1/DS1 Alel Dağılımının Tüm Çalışma Grubundaki Değerlendirilmesi

Tüm çalışma grubunun KIR3DL1/DS1 alel verisi Tablo 4-4 ve Şekil 4-7' de verilmiştir. KIR3DL1\*001 aleli Behçet hastalarında anlamlı olarak yüksek sıklıkta bulunmuştur (Behçet hastaları %51,2 ve sağlıklı kontroller %39,8;  $p = 0,018$ ; OR = 1,5; %95GA 1-2,3), KIR3DS1\*013 alel sıklığı ise sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak yüksektir (Behçet hastaları %34 ve sağlıklı kontroller %46,3;  $p = 0,009$ ; OR = 0,6 %95GA 0,4-0,8).

**Tablo 4-4: KIR3DL1/DS1 alellerinin tüm çalışma grubundaki dağılımı**

KIR3DL1/DS1 Aleleri	SK N=215	%	BH N=216	%	<i>p</i>	OR	%95GA
*001	86	<b>39,8</b>	110	<b>51,2</b>	<i>0,018</i>	1,5	1-2,3
*002	33	<b>15,3</b>	33	<b>15,3</b>			
*01502	23	<b>10,6</b>	35	<b>16,3</b>			
*004	50	<b>23,1</b>	35	<b>16,3</b>			
*005	29	<b>13,4</b>	23	<b>10,7</b>			
*007	14	<b>6,5</b>	22	<b>10,7</b>			
*008	33	<b>15,3</b>	38	<b>17,7</b>			
*013	100	<b>46,3</b>	73	<b>34</b>	<i>0,009</i>	0,6	0,4-0,8

KIR3DL1\*01502, \*007, \*008 alellerinin sıklığı Behçet hastalarında, \*004 ve \*005 alellerinin sıklığında sağlıklı kontrollerde yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4-7). Ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4-4).



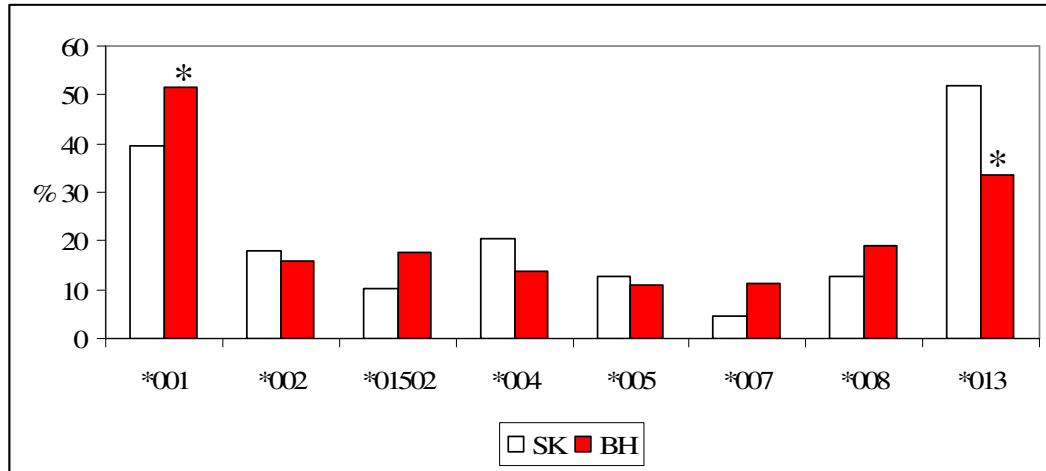
**Şekil 4-7: KIR3DL1/DS1 alellerinin tüm çalışma grubundaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

#### 4.2.2. KIR3DL1/DS1 Alel Dağılımının HLA-Bw4 ile Birlikte Değerlendirilmesi

KIR3DL1/DS1 alellerinin belirlendiği çalışma grubundaki dahilindeki sağlıklı kontrollerin %63,8'i, Behçet hastalarının %81,7'si HLA-Bw4 pozitifdir. Bu alt grupta belirlenen KIR3DL1/DS1 alel dağılımı Tablo 4-5'de verilmiştir. Bu grupta yapılan istatistiksel analizlerde Behçet hastalarında KIR3DL1\*001 aleli yüksek sıklıkta bulunmuştur (Behçet hastaları %51,4 ve sağlıklı kontroller %39,4;  $p = 0,038$ ; OR = 1,6; %95GA 1-2,5). Sağlıklı kontrollerde KIR3DL1\*013 alelinin sıklığı Behçet hastalarına göre anlamlı olarak daha yüksektir (Behçet hastaları %33,7 ve sağlıklı kontroller %52;  $p = 0,001$ ; OR = 0,47; %95GA 0,29-0,75). Diğer alellere ait dağılım farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4-8).

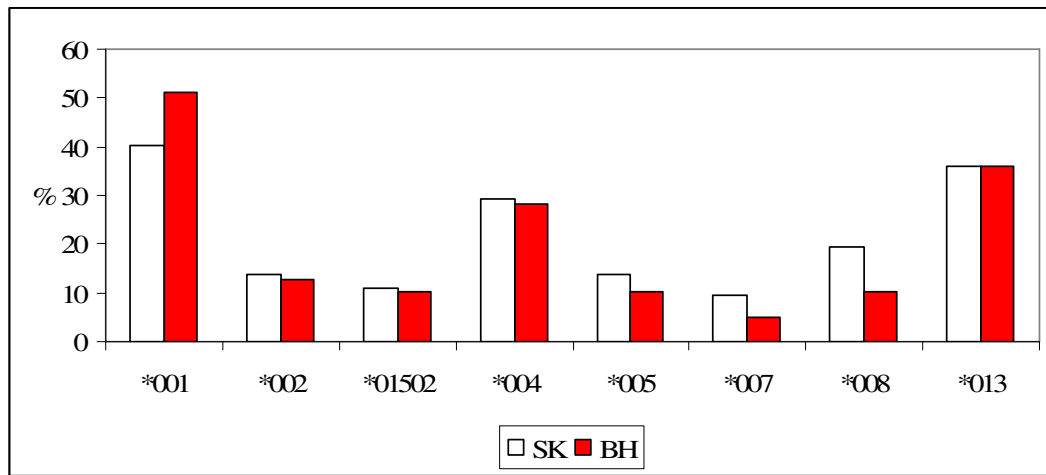
**Tablo 4-5: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı**

KIR3DL1/DS1 Alelleri	SK N=127	%	BH N=175	%	$p$	OR	%95 GA
<b>*001</b>	50	<b>39,4</b>	90	<b>51,4</b>	<i>0,038</i>	1,6	1 - 2,5
<b>*002</b>	23	<b>18,1</b>	28	<b>16</b>			
<b>*01502</b>	13	<b>10,2</b>	31	<b>17,7</b>			
<b>*004</b>	26	<b>20,5</b>	24	<b>13,7</b>			
<b>*005</b>	16	<b>12,6</b>	19	<b>10,9</b>			
<b>*007</b>	6	<b>4,7</b>	20	<b>11,4</b>			
<b>*008</b>	16	<b>12,6</b>	33	<b>18,9</b>			
<b>*013</b>	66	<b>52</b>	59	<b>33,7</b>	<i>0,001</i>	0,47	0,29-0,75



**Şekil 4-8: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

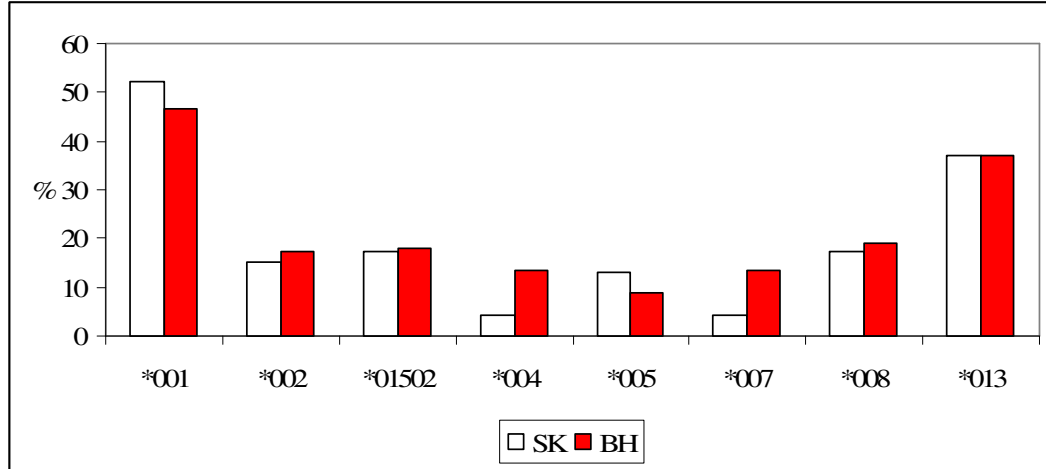
Sağlıklı kontrollerin %36,1'i, Behçet hastalarının %18,2'si HLA-Bw4 negatif alt grubu oluşturmaktadır. Bu gruptaki KIR3DL1/DS1 alel dağılımı Şekil 4-9'de verilmiştir, Behçet hastaları ve sağlıklı kontroller arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.



**Şekil 4-9: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 negatif gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

#### 4.2.3. KIR3DL1/DS1 Alellerinin HLA-B\*51 ile Birlikte Değerlendirilmesi

HLA-B\*51, Bw4 epitopu taşımaktadır. Bw4 pozitif alt grup HLA-B\*51'e göre sınıflandırılarak değerlendirilmiştir (Şekil4-1). HLA-Bw4 pozitif gruptaki Behçet hastalarının %72,5'i ve sağlıklı kontrollerin %36,2'si B\*51 pozitifdir. Bu gruba ait KIR3DL1/DS1 alel dağılımları Şekil 4-10'da verilmiştir, dağılım farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı değildir.

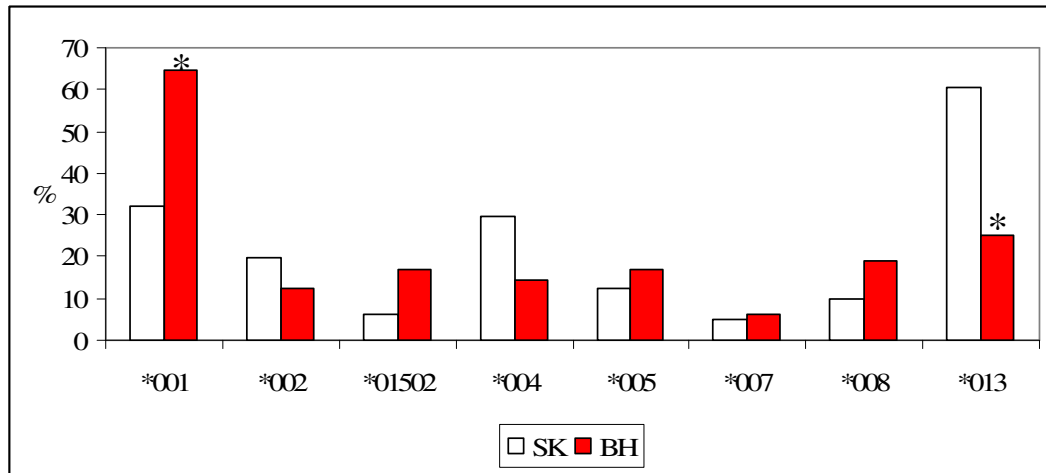


**Şekil 4-10: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 pozitif alt gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)**

HLA-Bw4 pozitif gruptaki sağlıklı kontrollerin %63,7'si, Behçet hastalarının %27,4'ü B\*51 negatif grubu oluşmaktadır. Bu grubun KIR3DL1/DS1 alel dağılımları Tablo 4-6'de ve Şekil 4-11'de verilmiştir. KIR3DL1\*001 alel sıklığı Behçet hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Behçet hastaları %64,6 ve sağlıklı kontroller %32,1;  $p = 0,0001$ ; OR = 3,8; %95GA 1,8-8,1). KIR3DS1\*013 alelinin sıklığı da yine sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak yüksektir (Behçet hastaları %25 ve sağlıklı kontroller %60,5;  $p = 0,0001$ ; OR = 0,2; %95GA 0,09-0,5). Diğer alellerin dağılımları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 4-6: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 negatif alt gruptaki dağılımı

KIR3DL1/DS1 Alelleri	SK N=81	%	BH N=48	%	<i>p</i>	OR	%95 GA
*001	26	32,1	31	64,6	0,0001	3,8	1,8 - 8,1
*002	16	19,8	6	12,5			
*01502	5	6,2	8	16,7			
*004	24	29,6	7	14,6			
*005	10	12,3	8	16,7			
*007	4	4,9	3	6,3			
*008	8	9,9	9	18,8			
*013	49	60,5	12	25	0,0001	0,2	0,09-0,5



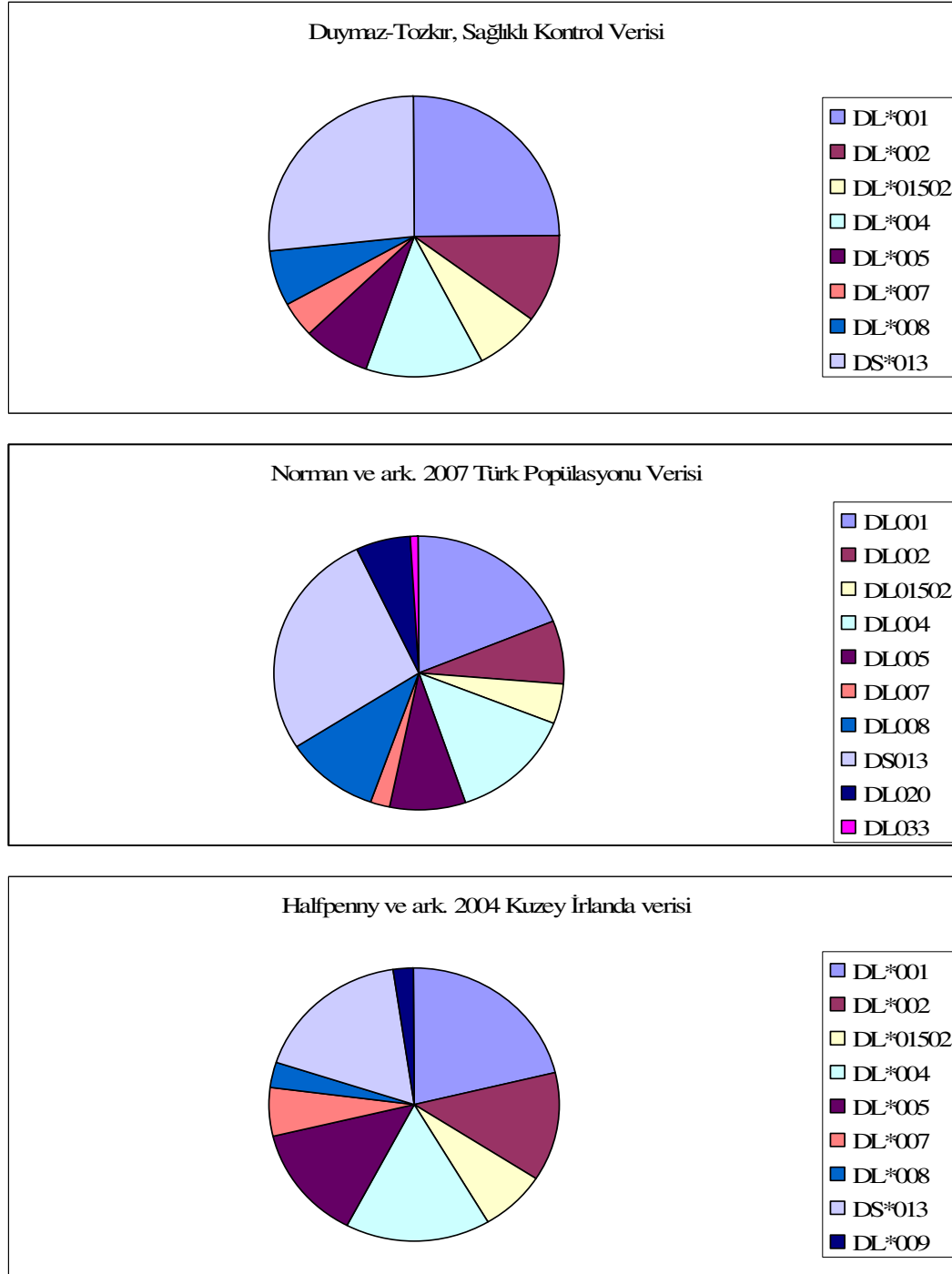
Şekil 4-11: KIR3DL1/DS1 alellerinin HLA-Bw4 pozitif B\*51 negatif alt gruptaki dağılımı (SK: Sağlıklı kontrol, BH: Behçet hastaları)

## 5. TARTIŞMA

Behçet hastalığının HLA-B\*51 ile ilişkisi patogeneizde genetik faktörlerin rol aldığını gösteren en güçlü bulgudur (Gül, Hajeer, Worthington, Barret ve ark. 2001). HLA-B\*51 dışındaki HLA-B alellerinin Behçet hastalığı ile ilişkisine bakıldığında, HLA-B\*2702 aleli de Behçet hastalarında yüksek sıklıkla bulunmuştur (Gül ve ark. 2002). HLA-B\*51 ve B\*2702 alellerinin dizileri karşılaştırıldığında, 77-83. pozisyonlardaki amino asitler arasına denk gelen, Bw4 motifinin ortak olduğu görülmüştür. Bu bölgenin yeni tanımlanan özelliği ise KIR3DL1'i bağlamasıdır. Bu çalışmanın ilk aşamasında inhibitör etkili KIR3DL1 yada aktive edici KIR3DS1'in Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerdeki gen içeriği, yani varlığı veya yokluğu incelenmiştir. Hem HLA-Bw4 pozitif grupta hem de bu grubun HLA-B\*51 negatif alt grubunda inhibitör etkili alelleri taşıyan KIR3DL1 / KIR3DL1 genotipi, Behçet hastalarında artmış olarak bulunmuştur. Çalışmanın ikinci aşamasında KIR3DL1/DS1 genine ait alellik farklılıkların Behçet hastalığının patogeneisine olası katkıları araştırılmıştır. Hem tüm grup, hem HLA-Bw4+ grup değerlendirmesinde Behçet hastalarında KIR3DL1\*001 sıklığı anlamlı olarak yüksek, KIR3DS1\*013 sıklığı ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur. HLA-Bw4+ grup B\*51'e göre ayrıştırıldığında, B\*51 taşımayan alt grupta bu farklılıkların daha belirgin olduğu görülmüştür.

KIR gen haplotiplerini gerek sağlıklı toplumda, gerekse hastalık ilişkilerinde irdeleyen pek çok çalışma olmasına rağmen, alel bazında inceleyen çalışmaların sayısı nispeten azdır. Halfpenny ve arkadaşları (2004) KIR3DL1/3DS1 alellerini sağlıklı kuzey İrlandalı kişilerden oluşan çalışma grubunda incelemişler ve KIR3DL1\*001, \*002, \*01502, \*004, \*005, \*007, \*008, \*009 ve KIR3DS1\*013 alellerinin dağılımını belirlemişlerdir. KIR3DL1/DS1 alellerinin farklı popülasyonlardaki dağılımına yönelik geniş çaplı bir başka çalışma Norman ve arkadaşları (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir. Türk popülasyonunun da dahil olduğu dünya çapındaki 28 farklı popülasyona ait örneklerin KIR3DL1/DS1 alel dağılımları çıkartılmıştır. Bunlara benzer diğer çalışmalarda da KIR3DL1/DS1 lokusuna ait çok sayıda alel tanımlanmıştır (Uhrberg ve ark, 1997, Gardiner ve ark, 2001). Bu çalışmada, daha önce bildirilen bu alellerden 9 tanesini belirlemeye yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metodun sınırlılıklarına rağmen belirlenen aleller yukarıdaki çalışmalarda (Halfpenny ve ark, 2004; Norman ve ark, 2007) gösterilen dağılımlarda nispeten sık rastlanan

aleller ile aynıdır (Şekil 5-1). Çalışmada hiç saptanmamış olan KIR3DL1\*006 aleli Norman ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada Afrikalılar'a özgü olarak belirlenmiştir.



Şekil 5-1: Çeşitli çalışmalardaki KIR3DL1/DS1 alel dağılımlarının karşılaştırılması

KIR alelik değişkenliklerinin işlevi açısından ilk farklılık ekspresyon düzeylerinde gözlenmiştir. Gardiner ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, farklı KIR3DL1 alellerinin DX9 antikorunu farklı düzeylerde bağladığı gösterilmiş ve farklılıkların alellerin hücre yüzeyindeki ekspresyon düzeylerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. KIR3DL1\*001, \*002, \*015 ve \*008 alelleri DX9 antikorunu yüksek bağlayan; KIR3DL1\*005, \*006 ve \*007 alelleri ise DX9 antikorunu düşük bağlayan aleller olarak bildirilmiştir. DX9 antikorunu yüksek ve düşük bağlayan alelleri heterozigot taşıyan bireylerde ise “bimodel” olarak adlandırılan, hem yüksek hem düşük bağlanmanın bir arada görüldüğü ikili paternler gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada heterozigot KIR3DL1 alellerine sahip kişilerde KIR3DL1 genlerinin, NK hücreleri üzerinde klonal olarak eksprese olduğu da bildirilmiştir. Yani KIR3DL1 açısından heterozigot olan bireylerde her iki KIR3DL1 alelini birden eksprese eden NK hücreleri, alellerden sadece birisini veya diğerini eksprese eden NK hücreleri veya her iki aleli de eksprese etmeyen NK hücreleri bulunabilmektedir. Bu açıdan hücre yüzeyindeki ekspresyon farkları NK hücre paternin cevabı açısından önem kazanmaktadır. DX9 antikorunu bağlama seviyesi yüksek olan alelleri eksprese eden NK klonlarının sıklığının da yüksek olduğu bildirilmiştir (Yawata ve ark. 2006). Behçet hastalarında sıklığı artmış olarak gösterilen KIR3DL1\*001 aleli DX9 antikorunu yüksek miktarda bağlamaktadır. Dolayısı ile hücre yüzeyinde yüksek miktarda eksprese olduğu, bu aleli eksprese eden NK klon sayısının da fazla olduğu öngörülebilir. Çalışmanın gelecekteki aşamalarında KIR3DL1 moleküllerinin hücre yüzeyindeki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi planmaktadır.

KIR3DL1 alelleri arasındaki fonksiyonel farklılıklar Yawata ve arkadaşları (2006) tarafından inhibisyon kapasitesi yönünde incelenmiş, DX9 antikorunu bağlama özellikleri açısından yüksek ve düşük KIR3DL1 alellerine sahip heterozigot bireylerin toplam (KIR3DL1 taşıyın veya taşımasın) NK hücreleri ile sadece KIR3DL1 taşıyan NK hücrelerini kıyaslanmıştır. NK hücrelerinin inhibisyonu hedef hücreler ile karşılaştıklarında ürettikleri hücre içi IFN $\gamma$  miktarına bakılarak değerlendirilmiştir. KIR3DL1 taşıyan hücre popülasyonu tek başına değerlendirildiğinde KIR3DL1 alelleri arasındaki inhibisyon hiyerarşisi KIR3DL1\*007<\*020<\*01502<\*005<\*001 olarak belirlenmiştir. KIR3DL1 taşıyın veya taşımasın toplam NK hücrelerine bakıldığında, aleller arasındaki hiyerarşik sırada 3DL1\*007<\*005<\*020<\*01502<\*001 şeklinde değişiklik olmuştur. Bu farklılık yazarlar tarafından NK klonları üzerinde

KIR3DL1\*005 gibi bazı alellerin ekspresyonunun düşük olması ile açıklanmıştır. İncelenen KIR3DL1 alelleri arasında inhibisyon kapasitesi en yüksek alel KIR3DL1\*001 olarak görülmektedir. KIR3DL1 alelleri arasında fonksiyonel farklılıkları gösteren başka bir çalışma Carr ve arkadaşları (2005) tarafından bildirilmiştir. NK hücre soyları ile yaptıkları çalışmada hem aynı HLA molekülü ile etkileşen farklı KIR3DL1 alelleri arasındaki inhibisyon farkını, hem de aynı KIR3DL1 molekülü ile etkileşen farklı HLA moleküllerinin ortaya çıkardığı inhibisyon farkını araştırmışlardır. KIR3DL1\*002 ve KIR3DL1\*007 alelleri ile HLA-B\*5101, B\*2705, B\*1502'i karşılaştırmışlar, KIR3DL1\*002 alelinin ve HLA-B\*5101'in daha fazla inhibisyon yaptığını bildirmişlerdir. KIR/HLA etkileşiminde hem KIR3DL1 alelleri, hem HLA-Bw4 alelleri fonksiyonel açıdan farklılıklar yaratabilmektedir.

HLA üzerindeki peptidin moleküler özellikleri de KIR ile bağlanmada önem taşıyabilmektedir. Thananchai ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada KIR3DL1\*001, \*01502, \*005 ve \*007 alelleri ile Bw4 epitopu taşıyan HLA moleküllerinin etkileşimi incelenmiş, KIR3DL1 alelleri arasında, viral peptitle yüklü tetramerlere bağlanma kapasitesi açısından da fark olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bağlanmanın tetramerler üzerine yüklenen farklı viral peptitlerden etkilendiği de gösterilmiştir. Kollnberger ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada da HLA üzerindeki peptidin özellikle 7-8.amino asitlerinin negatif yüklü olmasının KIR bağlanmasını engelleyebildiği gösterilmiştir. Falk ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan çalışmada B\*51 alellere özgü peptitler gösterilmiş olmasına rağmen bugüne kadar Behçet hastalığına özgü peptit tanımlanmamıştır. HLA-Bw4 ve B\*51 üzerindeki peptitlerin yapısal özellikleri nedeniyle KIR3DL1/DS1 alelleri ile etkileşimi arttırması veya engellemesi, bu reseptörlerin Behçet hastalığı patogenezindeki rolüne açıklık getirebilir.

Diğer yandan Behçet hastalarında düşük bulunan KIR3DS1\*013 aleli aktivasyon sinyali iletmektedir. Oysaki gen ve protein dizisi arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle KIR3DS1, KIR3DL1'in aktive edici aleli olarak tanımlanmıştır (Uhrberg ve ark. 1997; Wilson ve ark. 2000). KIR3DS1 molekülünün ligandı kesin olarak belirlenmemiş olmasına rağmen, KIR3DL1 ile moleküler benzerlikten ötürü, Bw4 alellerinin KIR3DS1'in de ligandı olabileceği öne sürülmektedir. HIV'li kişilerde KIR3DS1 / HLA-Bw4 birlikteliği ile AIDS hastalığının yavaş ilerleyişi arasında ilişki gösterilmiş, KIR3DS1 taşıyan, ancak HLA-Bw4 negatif olan kişilerde bu etki

saptanmamıştır. İki alelin birlikteliği sonucunda sinerjistik etki ortaya çıktığı bildirilmiştir (Martin, Gao ve ark. 2002). Buna karşılık O'Connor ve arkadaşları (2007) yaptıkları *in vitro* çalışmada KIR3DS1 ile Bw4 alellerinin etkileşmediklerini göstermişlerdir. Yazarlar KIR3DL1 ve KIR3DS1 arasındaki, hücre dışı ilmeklerde bulunan az sayıdaki farklılığın bağlanmada önemli olabileceğini ve KIR3DS1'in farklı bir liganda bağlanabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı şekilde Carr ve arkadaşları (2007) da yaptıkları çalışmada KIR3DS1 ile aktive olan NK hücrelerinden IFN- $\gamma$  salındığını, sitotoksik aktivitenin arttığını göstermişler, ancak Bw4 pozitif B\*5701 transfeksiyonu yapılan *Epstein Barr* virüs transforme B lenfoid hücre soyları ile KIR3DS1'in etkileşmediğini ortaya koymuşlardır. KIR3DS1, henüz bilemediğimiz bir ligandı bağlayarak hücreleri aktive ediyor olabilir veya olası KIR3DS1/HLABw4 etkileşiminde HLA tarafından sunulan peptit önemli olabilir.

KIR moleküllerinin infeksiyona immun yanıtta önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Martin, Gao ve ark. 2002; Khakoo ve ark. 2004). Behçet hastalığı ve viral infeksiyonlar arasındaki ilişki tartışma konusudur. Hulusi Behçet ilk tanımlamalarında klinik gözlemlerine dayanarak, hastalığın viral bir etiyolojisi olabileceğini öne sürmüştür (Behçet 1937, Behçet 1940). Sezer (1953) tarafından yapılan bir çalışmada Behçet hastalığına neden olan bir virüs rapor edilmiş, ancak bu virüsün varlığı başka çalışmalar ile doğrulanmamıştır. Daha sonra yapılan bir çok çalışmada etkili bir mikrobiyal ajan olarak HSV-1 suçlanmıştır (Eglin ve ark. 1982; Studd ve ark. 1991). Bu virüse ait HSP'ler ile insan HSP'leri arasındaki benzerliklerden ötürü çapraz reaksiyonların oluşabileceği ve hastalığın patogenezinde rol alabileceği de öne sürülmüştür (Pervin ve ark.1993). Dolayısı ile çalışmalarda öne sürülen virüsler veya bugün tam olarak tanımlayamadığımız bir virüs patogeneizde rol oynayabilir. Behçet hastalarında, NK hücresi, CD8 ya da  $\gamma\delta$  T hücresi gibi KIR eksprese eden hücrelerde aktivasyon fazında baskılanma olabilir. Bazı infeksiyon ajanlarına karşı yetersiz immün yanıt, bu ajanların dolaşımdan veya hücrelerden temizlenmesinde gecikmeye ve infeksiyonun kalıcılığına etki edebilir. Bu ajanlar nedeniyle oluşan kronik antijenik stimülasyon hastalığın etiopatogenezine katkıda bulunabilir.

Behçet hastalarının klinik verileri ile KIR3DL1/DS1 alelleri arasındaki ilişkinin incelenmesi de bu moleküllerin hastalığın gelişimindeki rolüne açıklık getirilmesine yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Behçet hastalarında KIR3DL1/DS1 alelleri açısından artmış inhibisyon yönünde veriler elde edilmiştir. Gerek KIR3DL1 alellerinin fonksiyonel farklılıkları açısından, gerekse HLA-Bw4/peptit/KIR etkileşimindeki moleküllerin yapısal özellikleri açısından KIR3DL1/DS1 moleküllerinin rol oynayabileceği mekanizmalar Behçet hastalığı patogeneğine yeni açılımlar getirebilir.

## KAYNAKLAR

- Akoğlu, T. (1997). Behçet Hastalığı Patogenezi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 2, 2: 80-86.
- Alvarez-Arias, D. ve Campbell, K.S. (2007). Protein Kinase C Regulates Expression and Function of Inhibitory Killer Cell Ig-Like Receptors in NK Cells. *The Journal of Immunology*, 179:5281-5290.
- Azizlerli, G., Köse, A.A., Sarica, R., Gül, A., Tutkun, I.T., Kulaç, M. ve ark. (2003). Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. *International Journal of Dermatology*. Oct;42(10):803-6.
- Behçet H. (1937). Über rezidivierende, aphthöse, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dermatologische Wochenschrift*; 36:1152-7.
- Behçet H. (1940). Some observations on the clinical picture of the so-called triple symptom complex. *Dermatologica*; 81:73-83.
- Belfort, R. ve Muccioli, C. (2003). The Treatment of Behçet. İçinde: Zierhut, M.ve Ohno, S. (Ed.), *Immunology of Behçet Disease*. Lisse, Hollanda: Swets&Zeitlinger; 145-150.
- Bontadini, A., Testi, M., Cuccia, M.C., Martinetti, M., Carcassi, C., Chiesa, A. ve ark. (2006). Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. *Journal of Translational Medicine*, Oct 27;4:44.
- Carr, W.H., Pando, M.J. ve Parham, P. (2005). KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *The Journal of Immunology*;175(8): 5222-5229.
- Carr, W.H., Rosen, D.B., Arase, H., Nixon, D.F., Michaelsson, J. ve Lanier, LL. (2007). KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *The Journal of Immunology*, 178(2):647-51.
- Carrington, M. ve Norman, P. (2003). The KIR Gene Cluster. Yayın Tarihi: 28 Mayıs 2003, Erişim: Ocak 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

- Chajek-Shaul, T., Pisanty, S., Knobler, H., Matzner, Y., Glick, M., Ron, N. ve ark. (1987). HLA-B51 may serve as an immunogenetic marker for a subgroup of patients with Behçet's syndrome. *The American Journal of Medicine*, 83 (4): 666-672.
- Chwae, Y.J., Chang, M.J., Park, S.M., Yoon, H., Park, H.J., Kim, S.J., ve Kim, J. (2002). Molecular Mechanism of the Activation-Induced Cell Death Inhibition Mediated by a p70 Inhibitory Killer Cell Ig-Like Receptor in Jurkat T Cells. *The Journal of Immunology*; 169: 3726-3735.
- Dilşen, N. (1997). Behçet Hastalığının Tarihçesi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 2, 2: 62-65.
- Direskeneli, H., Eksioğlu-Demiralp, E., Kibaroglu, A., Yavuz, S., Ergun, T. ve Akoglu, T. (1999). Oligoclonal T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 117:166-170.
- Direskeneli, H. (2001). Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Annals Rheumatic Diseases*, 60: 996-1002.
- Döhring, C. ve Colonna, M. (1996). Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *European Journal of Immunology*, 26: 365-369.
- Duymaz-Tozkır, J., Uyar, F.A., Saruhan-Direskeneli, G., Gül, A. (2006 September 6-9). Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene 3DL1/3DS1 Polymorphism in Behçet's Disease. *16th European Congress of Immunology*, Paris-Fransa.
- Eglin, R.P., Lehner, T. ve Subak-Sharpe, J.H. (1982). Detection of RNA complementary to herpes-simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet*; Dec 18; 2(8312):1356-1361.
- Ekşioğlu-Demiralp, E., Direskeneli, H., Ergun, T., Fresko, I. ve Akoğlu, T. (1999). Increased CD4+CD16+ and CD4+CD56+ T cell subsets in Behçet's Disease. *Rheumatology International*, 19: 23-26.
- Esin, S., Gül, A., Hodar, V., Jeddi-Tehrani, M., Dilsen, N., Konice, M. ve ark. (1997). Peripheral blood T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 107:520-27.
- Falk, K., Röttschke, O., Takiguchi, M., Gnau, V., Stevanovic, S., Günther, J., Rammensee, H.G. (1995). Peptide motifs of HLA-B51, -B52 and -B78 molecules, and implications for Behçet's disease. *International Immunology*, 7(2): 223-228.

- Fan, Q.R., Garboczi, D.N., Winter, C.C., Wagtmann, N., Long, E.O. ve Wiley, D.C. (1996). Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(14): 7178-7183.
- Freysdottir, J., Lau, S. ve Fortune, F. (1999). Gammadelta T cells in Behçet's Disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clinical & Experimental Immunology*, 118(3):451-457.
- Fujii, N., Minagawa, T., Nakane, A., Kato, F. ve Ohno S. (1983). Spontaneous production of gamma-interferon in cultures of T lymphocytes obtained from patients with Behçet's disease. *The Journal of Immunology*, 130(4):1683-1686.
- Gardiner, C.M., Guethlein, L.A., Shilling, H.G., Pando, M., Carr, W.H., Rajalingam, R. ve ark. (2001). Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *The Journal of Immunology*, 166: 2992-3001.
- Gumperz, J.E., Litwin, V., Phillips, J.H., Lanier, L.L. ve Parham, P. (1995). The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that Express NKB1, a putative HLA receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 181: 1133-1144.
- Gumperz, J.E., Valiante, N.M., Parham, P., Lanier, L.L. ve Tyan, D. (1996). Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *Journal of Experimental Medicine*, 183: 1817-1827.
- Gül, A., İnanç, M., Öcal, L., Aral, O. ve Koniçe, M. (2000). Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. *Annals Rheumatic Diseases*, 59: 622-625.
- Gül, A. (2001). Behçet's Disease: An Update on the pathogenesis. *Clinical & Experimental Immunology*, 19(Suppl.24): S6-S12.
- Gül, A., Hajeer, A.H., Worthington, J., Baret, J.H., Ollier, W.E.R. ve Silman, A.J. (2001). Evidence for linkage of the HLA-B locus in Behçet's disease, obtained using the transmission disequilibrium test. *Arthritis & Rheumatism*; 44(1): 239-241.

- Gül, A., Hajeer, A.H., Worthington, J., Ollier, W.E. ve Silman, A.J. (2001). Linkage mapping of a novel susceptibility locus for Behcet's disease to chromosome 6p22-23. *Arthritis & Rheumatism*, 44(11): 2693-2696.
- Gül, A., Uyar, F.A., Inanc, M., Ocal, L., Barrett, J.H., Aral, O. ve ark. (2002). A weak association of HLA-B\*2702 with Behcet's disease. *Genes and Immunity*, 3: 368-72.
- Gül, A. (2003). Cytokines in Behçet's Disease. İçinde: Zierhut M ve Ohno S. (Ed.), *Immunology of Behçet Disease*. Lisse, Hollanda: Swets&Zeitlinger; 73-79.
- Gul A. (2007). Standard and novel therapeutic approaches to Behçet's disease. *Drugs*, 67(14):2013-22.
- Halfpenny, I.A., Middleton, D., Barnett, Y.A. ve Williams, F. (2004). Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Human Immunology*, Jun; 65(6): 602-12.
- Hamzaoui, K., Ayed, K., Hamza, M. ve Touraine, J.L. (1988). Natural killer cells Behçet's disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 71(1): 126-131.
- Hamzaoui, K. ve Ayed, K. (1990a). High affinity interlekin-2 receptors on peripheral blood lymphocytes are decreased during active Behçet's disease. *Clinical & Experimental Rheumatology*, 8(1):100-1.
- Hamzaoui, K., Ayed, K., Slim, A., Hamza, M. ve Touraine, J. (1990b). Natural killer cell activity, interferon-gamma and antibodies to herpes viruses in patients with Behçet's disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 79: 28-34.
- International Study Group for Behcet's Disease (1990). Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*, 335: 1078-1080.
- Kaneko, F., Takahashi, Y., Muramatsu, R., Adachi, K., Miura, Y., Nakane, A. ve Minegawa, T. (1985). Natural killer cell number and function in peripheral lymphoid cells in Behçet's disease. *British Journal of Dermatology*, 113(3): 313-318.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J. ve ark. (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving Hepatitis C Virus infection. *Science*, 305: 872-874.

- Khakoo, S. ve Carrington, M. (2006). KIR and disease: a model system or system of models? *Immunological Reviews*, 214: 186-201.
- Kollnberger, S., Chan, A., Sun, M.Y., Chen, L.Y., Wright, C., di Gleria, K. ve ark. (2007). Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *European Journal of Immunology*; 37(5):1313-22.
- Kural-Seyahi, E., Fresko, I., Seyahi, N., Ozyazgan, Y., Mat, C., Hamuryudan, V. ve ark. (2003). The long-term mortality and morbidity of Behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore)*, Jan;82(1):60-76.
- Lehner, T., Lavery, E., Smith, R., van der Zee, R., Mizushima, Y. ve Shinnick, T. (1991). Association between the 65-kilodalton heat-shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infection and Immunity*, 59(4): 1434-1441.
- Li, B., Yang, P., Zhou, H., Zhang Z., Xie, C., Lin, X. ve ark. (2003). T-bet expression is upregulated in active Behçet's disease. *British Journal of Ophthalmology*, 87:1264-1267.
- López-Vázquez, A., Miña-Blanco, A., Martínez-Borra, J., Njobvu, P.D., Suárez-Alvarez, B., Blanco-Gelaz, M.A. ve ark. (2005). Interaction between KIR3DL1 and HLA-B\*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Human Immunology*, 66(3):285-9.
- Malnati, M.S., Perruzi, M., Parker, K.C., Biddison, W.E., Ciccone, E., Moretta, A. ve Long, E.O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science*, Feb 17; 267(5200): 1016-1018.
- Mantaş, C., Direskeneli, H., Ekşioğlu-Demiralp, E. ve Akoğlu, T. (1999). Serum levels of Th2 Cytokines IL-4 and IL-10 in Behçet's Disease. *Journal of Rheumatology*, 26(2):510-512.
- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.H., Nelson, G., Detels, R., Goedert, J.J. ve ark. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature Genetics*, 31: 429-434.
- Martin, M.P., Nelson, G., Lee, J.H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J. ve ark. (2002). Susceptibility to Psoriatic Arthritis: Influence of activating killer Ig-like receptor

- genes in the absence of specific HLA-C alleles. *The Journal of Immunology*, 169: 2818-2822.
- Martin, M.P., Bashirova, A., Traherne, J., Trowsdale, J. ve Carrington, M. (2003). Expansion of the KIR lokus by unequal crossing over. *The Journal of Immunology*, 171: 2192-2195.
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F. ve ark. (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nature Genetics*. 39(6):733-40.
- Mege, J.L., Dilsen, N., Sanguedolce, V., Gul, A., Bongrand, P., Roux, H. ve ark. (1993). Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behcet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *Journal of Rheumatology*, 20(9):1544-9.
- Middleton, D., Meenagh, A., Sleator, C., Gourraud, P.A., Ayna, T., Tozki, H. ve ark. (2007). No association of KIR genes with Behcet's disease. *Tissue Antigens*, 70(5): 435-8.
- Mizuki, N., Ota, M., Katsuyama, Y., Kazuro, Y., Ando, H., Goto, K. ve ark. (1999). Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behçet's disease. *Arthritis & Rheumatism*, 42 (9):1961-1966.
- Moretta, A., Tambussi, G., Bottino, C.C., Tripodi, G., Merli, A., Ciccone, E. ve ark. (1990). A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *Journal of Experimental Immunology*, 171: 695-714.
- Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: Rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology*, 2: 957-964.
- Namekawa, T., Snyder, M.R., Yen, J.H., Goehring, B.E., Leibson, P.J., Weyand, C.M. ve Goronzy, J. (2000). Killer Cell Activating Receptors Function as Costimulatory Molecules on CD4+CD28null T Cells Clonally Expanded in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*, 165: 1138-1145.

- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R.A. ve Margulies, D.H. (2002). Structure and Function of NK Cell Receptors: Multiple Molecular Solutions to Self, Nonself Discrimination. *Annual Reviews Immunology*, 20:853-885.
- Nelson, G.W., Martin, M.P., Gladman, D., Wade, J., Trowsdale, J. ve Carrington, M. (2004). Heterozygote advantage in autoimmune disease: Hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in Psoriatic Arthritis. *The Journal of Immunology*, 173:4273-4276.
- Niokou, D., Spyropoulou-Vlachou, M., Darlamitsou, A. ve Stavropoulos-Giokas, C. (2003). Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Human Immunology*, 64(12):1167-76.
- Nishida, T. ve Ohno, S. (2003) T cells in Behçet's Disease. İçinde: Zierhut, M. ve Ohno, S. (Ed.), *Immunology of Behçet Disease*. Lisse, Hollanda: Swets&Zeitlinger; 57-61.
- Norman, P.J., Stephens, H.A., Verity, D.H., Chandanayingyong, D. ve Vaughan, R.W. (2001). Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*, 52(3-4):195-205.
- Norman, P.J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Korbel, D., Gleimer, M., Rowley, D. ve ark. (2007). Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nature Genetics*, Sep;39(9):1092-9.
- O'Connor, G.M., Guinan, K.J., Cunningham, R.T., Middleton, D., Parham, P. ve Gardiner C.M. (2007). Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *The Journal of Immunology*, 178(1):235-41.
- Pando, M.J., Gardiner, C.M., Gleimer, M., McQueen, K.L. ve Parham P. (2003). The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *The Journal of Immunology*;171(12):6640-9.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology*, 5: 201-214.
- Perruzzi, M., Wagtmann, N. ve Long, E.O. (1996). A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B\*2705. *Journal of Experimental Medicine*, 184(4): 1585-1590.

- Pervin, K., Childerstone, A., Shinnick, T., Mizushima, Y., van der Zee, R., Hasan, A. ve ark. (1993). T cell epitope expression of mycobacterial and homologous human 65-kilodalton heat shock protein peptides in short term cell lines from patients with Behçet's disease. *The Journal of Immunology*, Aug 15;151(4):2273-82.
- Pronai, L., Ichikawa, Y., Nakazava, H. ve Arimori, S. (1991). Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leucocytes in Behçet disease- effects of colchicine. *Clinical & Experimental Immunology*, 9: 227-233.
- Rajagopalan, S. ve Long, E.O. (1997). The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *Journal of Experimental Medicine*, 185(8): 1523-1528.
- Raziuddin, S., Al-Dalaan, A., Bahabri, S., Siraj, A.K. ve Al-Sedairy, S. (1998). Divergent Cytokine Production Profile in Behçet's Disease. Altered Th1/Th2 Cell Cytokine Pattern. *Journal of Rheumatology*, 25(2):329-333.
- Rojo, S., Wagtmann, N. ve Long, E.O. (1997) Binding of a soluble p70 killer cell inhibitory receptor to HLA-B\*5101: requirement for all three p70 immunoglobulin domains. *European Journal of Immunology*, 27: 568-571.
- Sakane, T., Suzuki, N., Ueda, Y., Takada, S., Murakawa, Y., Hoshino, T. ve ark. (1986). Analysis of interleukin-2 activity in patients with Behçet's disease. *Arthritis & Rheumatism*, 29(3):371-8.
- Santourlidis, S., Trompeter, H.I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P. ve Uhrberg, M. (2002). Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *The Journal of Immunology*, 169(8):4253-61.
- Saruhan-Direskeneli, G., Uyar, F.A., Cefle, A., Onder, S.C., Eksioglu-Demiralp, E., Kamalı S. ve ark. (2004). Expression of KIR and C-type lectin receptors in Behçet's Disease. *Rheumatology*, 43(4):423-7.
- Sezer, F.N. (1953). The isolation of a virus as the cause of Behçet's diseases. *American Journal of Ophthalmology*; 36(3):301-15.

- Studd, M., McCance, D. J. ve Lehner, T. (1991). Detection of HSV-1 DNA in patients with Behcet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction. *The Journal of Medical Microbiology*, 34(1): 39-43.
- Sugi-Ikai, N., Nakazawa, M., Nakamura, S., Ohno, S. ve Minai, M. (1998). Increased frequencies of interleukin-2- and interferon-gamma-producing T cells in patients with active Behçet's disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 39: 996-1004.
- Suzuki, N., Takeno, M., Takeba, Y., Nagafuchi, H. ve Sakane, T. (2003) Autoimmunity in Behçet's Disease. İçinde: Zierhut M ve Ohno S. (Ed.), *Immunology of Behçet Disease*. Lisse, Hollanda: Swets&Zeitlinger; 81-85.
- Takeno, M., Shimoyama, Y., Kashiwakura, J., Nagafuchi, H., Sakane, T. ve Suzuki, N. (2004). Abnormal killer inhibitory receptor expression on natural killer cells in patients with Behçet's disease. *Rheumatology International*, 24(4): 212-6.
- Tasci, B., Direskeneli, H., Serdaroglu, P., Akman-Demir, G., Eraksoy, M. ve Saruhan-Direskenli G. (1998). Humoral immune response to mycobacterial heat shock protein (hsp)65 in the cerebrospinal fluid of neuro-Behçet patients. *Clinical Experimental Immunology*, 113(1):100-104.
- Thananchai, H., Gillespie, G., Martin, M.P., Bashirova, A., Yawata, N., Yawata, M., ve ark. (2007). Allele-specific and peptide dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *The Journal of Immunology*, 178:33-37.
- Trundley, A., Frebel, H., Jones, D., Chang, C. ve Trowsdale, J. (2007). Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *European Journal of Immunology*, 37(3):780-7.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B. ve ark. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 7: 753-763.
- Uhrberg, M., Parham, P. ve Wernet, P. (2002). Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, 54(4):221-9.

- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A. ve ark. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, 7(6):739-51.
- Velickovic, M., Velickovic, Z. ve Dunckley, H. (2006). Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Pacific Islands populations. *Immunogenetics*, Jul;58(7):523-32.
- Verity, D.H., Marr, J.E., Ohno, S., Wallace, G.R. ve Stanford, M.R. (1999). Behçet's Disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*, 54: 213-220.
- Vilches, C. ve Parham, P. (2002). KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annual Reviews Immunology*, 20:217-51
- Vivier, E. ve Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-Cell Receptors on T Cells: Witness of the Past, Actors of the Future. *Nature Reviews Immunology*, 4: 190-198.
- Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D. ve ark. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9): 4778-4783.
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A.M., Partheniou, F. ve Parham, P. (2006). Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *Journal of Experimental Medicine*, 203(3): 633-45.
- Yazıcı, H., Tüzün, Y., Pazarlı, H., Yurdakul, S., Ozyazgan, Y., Ozdogan, H. ve ark. (1984). Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behçet's disease. *Annals Rheumatic Diseases*, 43(6): 783-9.
- Yurdakul, S. (1997). Behçet Sendromunun Epidemiyolojisi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 2, 2: 66-67.
- Zouboulis, C. (2003). Epidemiology of Adamantiades-Behçet's Disease. İçinde: Zierhut, M. ve Ohno, S. (Ed.), *Immunology of Behçet Disease*. Lisse, Hollanda: Swets&Zeitlinger; 1-16.

**ETİK KURUL KARARI****İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

**Toplantı Tarihi:** 10.09.2003  
**Toplantı Yeri :** Behçet Kütüphanesi Pembe Salonu  
**Toplantı Sayısı:** 08  
**Prot.No.Sayısı :**

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Ahmet GÜL'ün üstlendiği "Behçet Hastalığı Patogenezinde Doğal Katil (Natural Killer, NK) Hücreleri Kır ve CD94 Reseptör Aileleri Allellerinin ve Gen Polimorfizmlerinin Rolü" başlıklı çalışma kurulumuzda incelendi, etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr.Deniz SARGIN

Prof.Dr.Mübeccel DEMİRKOL

Prof.Dr.Berrin UMMAN

Prof.Dr.Cahide GÖKKUŞU

Prof.Dr.Koray ACARLI

Prof.Dr.Selim BADUR

Prof.Dr.Aykan CANBERK

Prof.Dr.Emin DARENDELİLER

Prof.Dr.Beyhan ÖMER

Prof.Dr.Oğuzhan ÇOBAN

Prof.Dr.Veli UYSAL

Prof.Dr.Kamil PEMBEÇİ

Prof.Dr.Nuran YILDIRIM

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	JÜLİDE	<b>Soyadı</b>	DUYMAZ-TOZKIR
<b>Doğ.Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ.Tar.</b>	15/09/1975
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	30292865094
<b>Email</b>	jduymaz@gmail.com	<b>Tel</b>	02124142253

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI	2008
<b>Yük.Lis.</b>	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI	2002
<b>Lisans</b>	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	1997
<b>Lise</b>	KADIKÖY KIZ LİSESİ	1992

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI	2002-2008
2.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Zayıf	67,5	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	59	60	60

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Microsoft Word	İyi
Microsoft Exel	İyi
Microsoft Powerpoint	İyi

### Yayımları

1. G Saruhan-Direskeneli, M.Inanc, I Fresko, N Akkoc, E Dalkilic, E Erken, Y Karaaslan, G Kinikli, F Oksel, S Pay, E Yucel, SP Yentur, **J Duymaz-Tozkir**, V Yilmaz, N Inanc, H Yazici, M Konice, H Direskeneli: The Role of HLA-DRB1 Shared Epitope Alleles in Predicting Short-Term Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. (Rheumatology 2007 Dec;46(12):1842-4.)
2. **J Duymaz Tozkir**, V Yılmaz, FA Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: Polymorphisms of IL-8 (CXCL8) and its receptor CXCR2 are not associated with Behçet's Disease. (J Rheumatol. 2005 Jan;32(1):93-7.)
3. **J Duymaz Tozkir**, A Gül, FA Uyar, U Özbek, G Saruhan-Direskeneli: Tumour necrosis factor-alpha gene promoter region -308 and -376 G→A polymorphisms in Behcet's disease. (Clin Exp Rheumatol. 2003 Jul-Aug;21(4 Suppl 30):S15-8.)

### Tebliğleri

#### Uluslararası Toplantılarda Sözlü Sunulan Bildirileri:

- **Julide Duymaz-Tozkir**, F Aytul Uyar, Guher Saruhan-Direskeneli, Ahmet Gul: No association of the TNF receptor superfamily 1A gene R92Q mutation with Behçet Disease. 12th International Conference on Behçet's Disease. September 19-23, 2006. Lisbon-Portekiz.
- **Julide Duymaz-Tozkir**, Fulya Coşan, Basar Oku, Aris Cakiris, Duran Ustek, Guher Saruhan-Direskeneli, Ahmet Gul: No association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with Behçet's disease and rheumatic heart disease. 12th International Conference on Behçet's Disease. September 19-23, 2006. Lisbon-Portekiz.
- Umut Can Kucuksezer, **Julide Duymaz-Tozkir**, Ahmet Gul, Guher Saruhan-Direskeneli: Granzyme B gene polymorphism in Behçet's Disease. 12th International Conference on Behçet's Disease. September 19-23, 2006. Lisbon-Portekiz.
- **J Duymaz-Tozkir**, FA Uyar, G Saruhan-Direskeneli, A Gül: Killer Immunoglobulin-like Receptor Gene 3DL1/3DS1 Polymorphism in Behçet's Disease. XI. International Conference On Behçet's Disease, October 27-31,2004. Antalya-Türkiye.

- J Duymaz Tozkır, V Yılmaz, FA Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: Polymorphisms of IL-8 (CXCL8) and Its Receptor CXCR2 are Not Associated with Behçet's Disease. 15<sup>th</sup> European Immunology Congress, EFIS2003, June 8-12, 2003. Rhodes-Yunanistan.
- V Yılmaz, J Duymaz, FA Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: The polymorphisms of CXCR-2 in Behçet's Disease, 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 22-27, 2001. Stockholm-İsveç.

#### **Uluslararası Toplantılarda Poster Olarak Sunulan Bildirileri:**

- Julide Duymaz Tozkır, F.Aytul Uyar, Guher Saruhan Direskeneli, Ahmet Gul. Association of Killer Immunoglobulin-like Receptor Gene 3DL1/3DS1 Polymorphism with Behçet's Disease is Stronger in Male Patients. ACR/ARHP 07 Scientific Meeting 07, Nov 6-11, 2007. Boston- ABD.
- J Duymaz-Tozkır, FA Uyar, G Saruhan-Direskeneli, A Gul: Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene 3DL1/3DS1 Polymorphism in Behçet's Disease. 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, September 6-9, 2006. Paris-Fransa.
- J Duymaz Tozkır, V Yılmaz, FA Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: Polymorphisms of IL-8 (CXCL8) and its Receptor CXCR2 are not Associated with Behçet's Disease. 15<sup>th</sup> European Immunology Congress, EFIS2003, June 8-12, 2003, Rhodes-Yunanistan.
- Duymaz J, Uyar FA, Saruhan Direskeneli G and Gül A.: Interleukin-8 gene polymorphism in Behçet's Disease, 10<sup>th</sup> International Conference on Behçet's Disease, June 27-29, 2002. Berlin-Almanya.
- Yılmaz V, Duymaz J, Uyar FA, Gül A, Saruhan Direskeneli G. : Polymorphisms of CXCR-2 in Behçet's Disease, 10<sup>th</sup> International Conference on Behçet's Disease, June 27-29, 2002. Berlin-Almanya.
- J Duymaz, A Gül, FA Uyar, U Özbek, G Saruhan-Direskeneli: No association of tumour necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region -308 polymorphism with Behçet's disease, 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 22-27, 2001. Stockholm-İsveç.
- Duymaz J, Gül A, Uyar FA, Özbek U, Saruhan-Direskeneli G: No association of tumour necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region -308 polymorphism with Behçet's disease. 9<sup>th</sup> International Congress on Behçet's Disease, May 27-29, 2000. Seoul-Kore.

### **Ulusal Toplantıda Sözlü Sunulan Bildirileri:**

- J Duymaz-Tozkır, FA Uyar, G Saruhan-Direskeneli, A Gül: Behçet Hastalığında KIR3DL1/3DS1 Alel Dağılımı. XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi 21-24 Kasım 2007, Antalya.
- J Duymaz-Tozkır, FA Uyar, G Saruhan-Direskeneli, A Gül: Behçet Hastalığında KIR3DL1/3DS1 Polimorfizmi ve HLA-Bw4 ile İlişkisi. 10. Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi 31 Mart-01 Nisan 2006, İstanbul.
- J Duymaz-Tozkır, N Yıldız, NB Hasbal, N Işık, G Saruhan-Direskeneli. Mutipl Skleroz Hastalarında Gen Polimorfizmleri. XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 07-10 Eylül 2005, Bursa.
- J Duymaz-Tozkır, G Akman-Demir, P Serdaroğlu, A Gül, G Saruhan-Direskeneli. Nöro-Behçet Sendromu'nda TNF-alfa ve IL-8 Gen Polimorfizmleri. II. Ulusal Nörobilim Kongresi, 16-20 Nisan 2003, Bursa.
- J Duymaz, A Gül, FA Uyar, U Özbek, G Saruhan-Direskeneli: Behçet hastalığının Tümör nekroz faktör- $\alpha$  geni polimorfizleri ile ilişkisi, XVI.Ulusal İmmunoloji Kongresi, 9-13 Mayıs 2001, Belek, Antalya.
- V Yılmaz, J Duymaz, F.A Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: Behçet Hastalığında CXCR-2 Polimorfizmleri, XVI. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 9-13 Mayıs 2001, Antalya.
- J Duymaz, A Gül, FA Uyar, U Özbek, G Saruhan-Direskeneli: Behçet hastalığının Tümör nekroz faktör- $\alpha$  geni polimorfizleri ile ilişkisi, VIII.Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi, 29-30 Kasım 2001, İstanbul.
- Duymaz J, Uyar FA, Saruhan Direskeneli G and Gül A. İnterlökin-8 Gen Polimorfizmlerinin Behçet Hastalığı Patogenezindeki Yeri, VIII.Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi, 29-30 Kasım 2001, İstanbul.
- V Yılmaz, J Duymaz, F.A Uyar, A Gül, G Saruhan-Direskeneli: Behçet Hastalığında CXCR-2 Polimorfizmleri, VIII.Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi, 29-30 Kasım 2001, İstanbul.

**Ödülleri:**

- Genç Araştırmacı Ödülü  
XIX. Ulusal İmmünoloji Kongresi 21-24 Kasım 2007, Antalya.
- Hulusi Behçet Genç Araştırmacı Ödülü  
10. Ulusal Behçet Hastalığı Kongresi, 31 Mart-01 Nisan 2006, İstanbul.

**Sertifikaları:**

- 1st Turkish-US Flow Cytometry Workshop. October 25-28, 2007 - İstanbul.
- Beckman Coulter EPICS XL-MCL ve EXPO32 Yazılımı Kullanıcı Eğitim Sertifikası. 29-31 Ocak 2007, İstanbul.
- Ix. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi, 23-27 Haziran 2003, İstanbul.
- 39. Ulusal Diyabet Kongresi “Pankreas Adacık Kursu”, 11 Mayıs 2003, İstanbul.
- Türk İmmünoloji Derneği 4. İmmünoloji Kursu, 5-8 Mayıs 2002, Pamukkale-Denizli.
- Türk İmmünoloji Derneği 3. İmmünoloji Kursu, 11-13 Mayıs 2000, Ilgaz-Kastamonu.