

Behçet Hastalarında Swap70 Antikorumunun İncelenmesi

Investigation of Swap70 Antibody in Patients With Behçet's Disease

Elif Uğurel^a, Aydın Karabulut^a, Ahmet Gül^b, Ali Osmay Güre^c,
Erdem Tüzün^d, Uğur Özbek^a, Burçak Vural^{a,*}

a İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
b İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.D., Romatoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye
c İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye
d İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Behçet hastalığı genel olarak tekrarlayan oral aftlar, genital ülserasyonlar, deri lezyonları ve üveit ile karakterize olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığının etiopatogenezi bilinmemektedir. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir. Behçet hastalığının patogenezinin belirlenmesine yönelik SEREX yöntemi ile yapılan önceki çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, SWAP70 antijenine karşı olduğu gözlenen otoantikor yanıtının, Behçet hasta alt gruplarından vasküler tutulum ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, SWAP70 geninin klonlanarak ekspresyonunun gerçekleştirilmesi ve elde edilen antijene karşı oluşacak otoantikor yanıtının Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. SWAP70 geni, pQE-30 vektörü yardımıyla E.coli M15(pREP4) hücrelerinde klonlandı ve eksprese olan antijene karşı oluşan antikor yanıtı, Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular:SWAP70 antikor yanıtının belirlenmesi açısından hastalar ve kontrollerdeki seropozitiflik değerlendirildi ve hastalarda %10 oranında SWAP70 için pozitiflik bulunurken kontrollerde belirlenmedi. Seropozitif ve seronegatif hastalardaki SWAP70 antikorlarının Behçet hasta alt gruplarındaki dağılımına bakıldığında ise anlamlı bir fark bulunamadı. Sonuç: SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının, Behçet hastalığı patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılması ve belirlenmesi için daha geniş hasta popülasyonlarında çalışılması gerekmektedir.

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

SUMMARY

Behçet's disease is a chronic inflammatory disorder characterized mainly by recurrent oral aphthous ulcerations, genital ulcerations, skin lesions and uveitis. The etiopathogenesis of Behçet's disease is unknown. It has long been postulated that immunological abnormalities, which are possibly induced by microbial pathogens in genetically susceptible individuals, are important in its pathogenesis. According to the results of our previous study for investigating pathogenesis of Behçet's disease by SEREX, autoantibody response to SWAP70 antigen was detected to be associated with vascular involvement among Behçet's disease subgroups. In this study, our aim was to get expression of SWAP70 gene by cloning and determine autoantibody response to this antigen in sera of Behçet's disease patients and healthy control subjects by ELISA. SWAP70 gene was cloned in E.coli M15(pREP4) cells by pQE-30 vector and autoantibody response to expressed antigen was studied by ELISA in the sera of BD patients and healthy control subjects. Seropositivity in patients and controls was evaluated for identifying SWAP70 antibody response and there was found 10% positivity for SWAP70 in patients but not in controls. Additionally, there was no significant difference in the distribution of SWAP70 antibodies of seropositive and seronegative patients in Behçet's disease subgroups. To further assess and determine the role of SWAP70 antibody in the pathogenesis of Behçet's disease, larger patient groups are required to be studied.

Key Words: Behçet's disease, SWAP70, ELISA, antibody response

Giriş ve Amaç

Behçet hastalığı (BH) heterojen özellikte, tekrarlayan ataklar ile karakterize, patogenezi ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bir multisistem inflamatuvar hastalıktır. Tekrarlayan oral ve genital ülserler ve panüveit ile karakterizedir. Hastalığın klasik triadı 1937' de Hulusi Behçet tarafından tanımlanan tekrarlayan oral ve genital ülserler ile hipopyonlu iritistir (1). BH bilinmeyen etiyolojisi ile kronik inflamatuvar bir bozukluktur. Genetik olarak yatkın bireylerde mikrobiyal patojenlerin tetiklediği immunolojik anormalliklerin, hastalığın patogenezinde önemli olduğu uzun zamandır öne sürülmektedir.

BH'da monosit ve lenfositlerin çeşitli sitokinleri artmış oranda eksprese ettiği bildirilmiştir. Genellikle Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış sekresyonu, hastalığın özellikle aktif döneminde belirgindir. Ayrıca hastalığın kliniksel aktivitesi ile birlikte seyreden oligoklonal T hücre genişlemesi, BH'nın immunopatogenezinde antijen kaynaklı immun yanıtı gösterir (2). BH'da T hücrelerini uyaran birçok antijen bulunmuştur. T hücreleri streptokokal antijenler tarafından IL-6, IFN ve nötrofilik faktörleri üretmek için uyarılabilir. Ayrıca HSP kaynaklı peptidler de BH'da T hücre proliferasyonunu uyarabilir (3). BH'da otoantijen olarak aday gösterilen Hsp70

ve bu antijene karşı oluşan antikorun Behçet hastalarının serumlarında yüksek titrasyonda bulunduğu gösterilmiştir (4). BH'da aday gösterilen otoantijenlere, ırsı şoku proteinleri ile birlikte anti-endothelial hücre antikoruna, retinal S antijeni, tropomiyosin, kinectin, Sip-1 ve SBP antijenleri de verilebilir (5,6,7,8,9,10).

BH'nın patogenezinin belirlenmesine yönelik SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, rekombinan cDNA ekspresyon kütüphanelerinin serolojik analizi) yöntemi ile yapılan önceki çalışmalarımızda insan testis cDNA kütüphanesi, Behçet hastalarının serum havuzunda taranmıştır. Serum havuzu taramalarında PINK1 antijenine karşı olduğu belirlenen antikor yanıtı, sadece Behçet hastalarında gözlenmiş ve BH'na özgü aday bir otoantijen olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Behçet hasta alt grup analizlerinde, SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtının, vasküler tutulum ile bağlantılı olduğu belirlenmiş ve BH ile anlamlı bir ilişkisinin olduğu ortaya konmuştur (11).

SWAP70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm (switch) bölgesi substratları arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (12). SWAP70 protein ekspresyonu, dönüşüm gösteren B hücre

soyularında ve dönüşüm için uyarılmış B lenfositlerinde bulunmuştur (13). Ayrıca SWAP70'in ekspresyonu, aktive olmuş B hücrelerinin dışında kandan köken alan mast hücreleri ve kemik iliğinden köken alan mast hücrelerinde de bulunmuştur (14). Sınıf dönüşümü için, SWAP70 ekspresyonu, belirli bir Ig izotipine spesifik değildir (12). B hücrelerinin aktivasyonu ile SWAP70, sitoplazmadan membrana doğru lokalize olur ve burada B hücre reseptörleri ile ilişki kurar. B hücre nükleusunda DNA tamir proteinleri de olmak üzere birçok proteinle etkileşime geçer. Bu yüzden SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu ve nükleer olayları aktive edebileceği, ayrıca membran ya da sitoplazma sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (15,16).

Önceki çalışmamızda özellikle BH'da vasküler tutulum ile ilişkili bulunan SWAP70'in, bu çalışmada geninin klonlanarak E. coli'de ekspresyonunun gerçekleştirilmesi ve elde edilen antijene karşı oluşacak otoantikör yanıtının Behçet hasta ve sağlıklı kontrol serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Bu çalışma için, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalında Behçet hastalığı tanısı ile izlenen ve tedavi edilen hastaların (n=99; yaş ortalaması 41,51±13,98), rutin kan analizleri sırasında alınmış olan serum örnekleri toplandı. Behçet hastalarına ait serumlar baskın klinik bulgularına göre dört gruba ayrıldı: Deri/mukoza tutulumu (eritema nodozum varlığı, n=23), göz tutulumu (üveit varlığı, n=20), eklem tutulumu (akut artrit bulgusu, n=28), vasküler tutulum (derin ven trombozu bulgusu, n=28). Çalışmada yer alan kontrol grubu, İstanbul Üniversitesi çalışanlarından ve/veya İstanbul Tıp Fakültesi Kan Bankası'ndan toplanan, sağlıklı kişilere ait (n=100; yaş ortalaması 40,87±19,30) serum örneklerinden oluşmaktadır. Serum örnekleri ayrıldıktan sonra, -80 °C'de çalışma için saklandı.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul'u (Protokol No: 2008/3002) tarafından onaylanmış ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 3351).

SWAP70 Gen Klonlanması:

SWAP70 geni, karaciğer mRNA'sından sentezlenmiş cDNA kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tam uzunlukta (full length) amplifiye edildi. Bunun için

Expand Long Template PCR System (Roche) kullanıldı. SWAP70 geni için gerekli olan primer çiftleri, 5' uçlarına ilgili restriksiyon bölgeleri eklenerek dizayn edildi: 5' TTTATTGGATCCATGGGGAGCTTGAAGGAGGAGCTG 3' (Forward) ve 5' TTTATTGTGCGACTCACTCCGTGGTCTTTTCTCTTTCC 3' (Reverse). Isı kondüsyonları, başlangıç denatürasyonu 2 dk 92 °C, 35 döngü boyunca 15 sn 92 °C, 30 sn 65 °C, 4 dk 68 °C, final ekstensiyon 7 dk 68 °C olacak şekildedir. SWAP70 gen ürünü %1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi ve "Gel Extraction Kit" (Qiagen) ile purifiye edildi. Ardından BamHI ve Sail restriksiyon enzimleri (Fermentas) ile SWAP70 ve klonlamada kullanılan pQE-30 vektörünün (Qiagen) 37 °C'de gece boyu enzim kesimi gerçekleştirildi. Ayrıca plazmid enzim kesim ürünü, Calf Intestine Alkalın Fosfat (CIP) enzimi (Fermentas) ile 37 °C'de 30 dk defosforile edildi. Enzim kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülendi ve tekrar purifiye edildi. SWAP70 ve pQE-30 plazmidinin miktarları NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile ölçülerek hesaplandı. Ligasyon reaksiyonu için plazmid miktarı, daha önceden belirtildiği gibi, total reaksiyonda en az 25 ng olacak şekilde alındı ve baz çifti uzunluklarına bağlı olarak SWAP70 ürünü 1/3 oranında eklendi (17). Yeterli miktarda T4 DNA Ligaz (Roche) enzimi protokol doğrultusunda reaksiyona konuldu. Ligasyon tüpleri 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi.

Transformasyon:

Klonlamada kullanılan E. Coli M15(pREP4) (Qiagen) hücreleri, üretici firmanın protokolleri doğrultusunda kompetan hücre haline getirildi ve ısı şoku yöntemi ile transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyonun etkinliği için pQE-40 (Qiagen) plazmid pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca antibiyotik aktivitesinin kontrolü için ayrılan E. Coli M15(pREP4) hücreleri, plazmid içermeyecek şekilde sadece Tris-EDTA ile transforme edildi. 25 ug/ml Kanamisin ve 100 ug/ml Ampisilin içeren LB agar petrilere cam bagnet ile yayıldı. Ertesi gün üreme gözlenen petrilere tek bir koloni alınarak aym miktarda antibiyotik içeren sıvı LB besiyerinde 37 °C'de çoğaltıldı ve bir kısmı alınarak MiniPrep Kit (Qiagen) ile plazmid izolasyonu yapıldı. Geriye kalan kültürden gliserol stoğu yapılarak -80 °C'de saklandı. Plazmidin önceden anlatıldığı gibi restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirildi ve %1'lik agaroz jelde görüntülendi. Daha sonra plazmidlerin konfirmasyon amacıyla dizilemesi yapıldı.

Protein Purifikasyonu:

Gliserol stoğundan alınarak antibiyotik içeren sıvı LB besiyerine eklendi ve gece boyu kültüre edildikten sonra antibiyotik içeren 500 ml sıvı LB besiyerinde O.D. 0,6 olana kadar çoğaltıldı. Bu aşamada kültüre 1 M IPTG eklenerek 6xHisTag protein ekspresyonu için indüklendi. Kültür santrifüj edilerek elde edilen pellet hücreleri, Buffer A (6M Gu-HCl; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl) çözeltisi ile lizis edildi. 10000 rpm'de 20 dk santrifüjün ardından elde edilen supernatana Ni-NTA agaroz (Qiagen) eklenerek 1 saat karıştırıldı. 6xHisTag protein purifikasyonu için metal afinite kromatografisi uygulandı. Nikel içeren karışım, filtrelili kolondan (Qiagen) geçirilerek sırasıyla Buffer B, C, D ve son olarak E (8M Urea; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris-Cl) eklendi. Sıvı akışı peristaltik pompayla ayarlandı ve tüm aşamalar, üretici firmanın protokollerine uygun olarak yapıldı. Purifiye edilen proteinler NanoDrop ND-1000 cihazında 280 nm dalga boyunda optik dansiteleri (OD) ölçüldükten sonra konsantrasyonları Bradford Assay (Pierce) ile belirlendi ve proteinler SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yürütülerek gümüş boyama yöntemi ile görüntülendi.

ELISA:

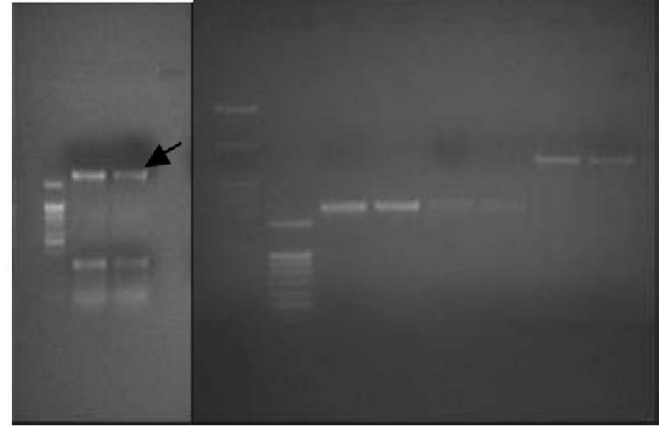
ELISA plakları 1?g/ml olacak şekilde SWAP70 proteini ile kaplandı. Gece boyu +4 °C'de inkübasyonun ardından PBS+tween (%0.1) ile yıkandı. Plaklar %5 lik süt tozu içeren PBS ile bloke edildikten sonra 1/100 dilüsyondaki hasta ve kontrol serumuyla gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Plaklar PBS+tween (%0.1) ile yıkandıktan sonra 1/2000 dilüsyondaki ikincil antikor (goat a-human IgG-AP conjugated) (Southern Biotech) eklendi. 2 saatlik inkübasyonun ve PBS+tween (%0.1) yıkamasının ardından AttoPhos substrat (Promega) üretici firmanın protokolleri doğrultusunda eklendi ve karanlıkta 45 dk inkübe edildi. Plaklar daha sonra floresan okuyucu ELISA cihazında 450/50 eksitasyon ve 580/50 emisyonunda okundu. Alınan floresan sinyaller, Excell'de (Microsoft Windows, 2007) değerlendirildikten sonra GraphPad Prism 5 programında istatistiksel olarak analiz edildi.

SONUÇ

SWAP70 Gen Klonlanması ve Protein Purifikasyonu:

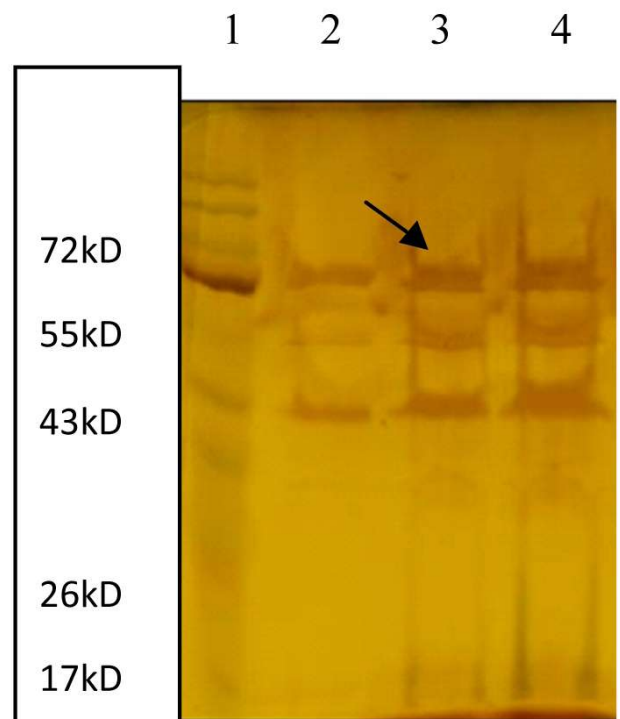
SWAP70 geni (1758 bp) açık okuma çerçevesi göz önünde bulundurularak uygun primerlerle amplifiye edildi ve %1'lik agaroz jelde görüntülendi. Jelden purifiye edildikten sonra pQE-30 plazmidi ile birlikte BamH I ve Sal I restriksiyon enzimleriyle kesim gerçekleştirildi (Şekil 1).

1 2 3 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 1: Soldaki resim SWAP70 PCR gen ürününün jel görüntüsü, 1: Marker, 2-3: SWAP70 (Ok ile gösterilmiştir). Sağdaki resim, SWAP70 enzim kesiminin jel görüntüsü, 1-2: Marker, 3-6: SWAP70, 7-8: pQE-30.

T4 DNA Ligaz enziminin katalizlediği ligasyon reaksiyonu E. coli M15 kompetan hücrelere transforme edildikten sonra antibiyotik içeren LB petrilere yayıldı. SWAP70 ve pQE-40 (pozitif kontrol) plaklarında koloniler gözlenirken, Tris-EDTA plağında (negatif kontrol) üreme gözlenmemiştir. SWAP70 klonları uygun şartlarda kültüre edilip 6xHis tag protein ekspresyonu için indüklendi. Ardından protein purifikasyonu, Ni-NTA resin kullanılarak oluşturulan matrikste metal afinite kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi ve SWAP70 proteini SDS-PAGE'de 70 kD bant olarak görüntülendi (Şekil 2).



ELISA:

Behçet hasta (n=99) ve sağlıklı kontrol (n=100) serum örneklerinde, ayrıca SEREX çalışmalarında kullanılan bazı serum örneklerinde de SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtı ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Önceki SEREX çalışmalarında SWAP70 seropozitif veya seronegatif bulunan Behçet hastalarının (n=31) ve sağlıklı kontrollerin (n=10) serum örneklerindeki SWAP70 antikor yanıtı, ELISA yöntemi ile değerlendirildi ve daha sonra sonuçlar, SEREX bulguları ile karşılaştırıldı. Bunun için ELISA'dan elde edilen sinyaller baz alınarak kesim noktaları (cut off points) belirlendi. Bu

kesim noktalarına göre SEREX ile ELISA sonuçları arasındaki benzerlik oranının yanında, sensitivite (duyarlılık) ve spesifisite (özgünlük) oranları da değerlendirildi (Tablo 2). Hem SEREX, hem de ELISA ile çalışılmış bu küçük hasta ve kontrol grubunda yüksek olan ELISA değerleri, SEREX seropozitivitesi ile paralellik göstermektedir. Her iki yöntemin %100 benzer sonuçlar verdiği durumda özgünlük %90 iken duyarlılık %3-13 olarak bulundu. ELISA değerleri azaldıkça duyarlılık artmaktadır fakat bu durumda SEREX benzerlik oranı paralel olarak azalmaktadır.

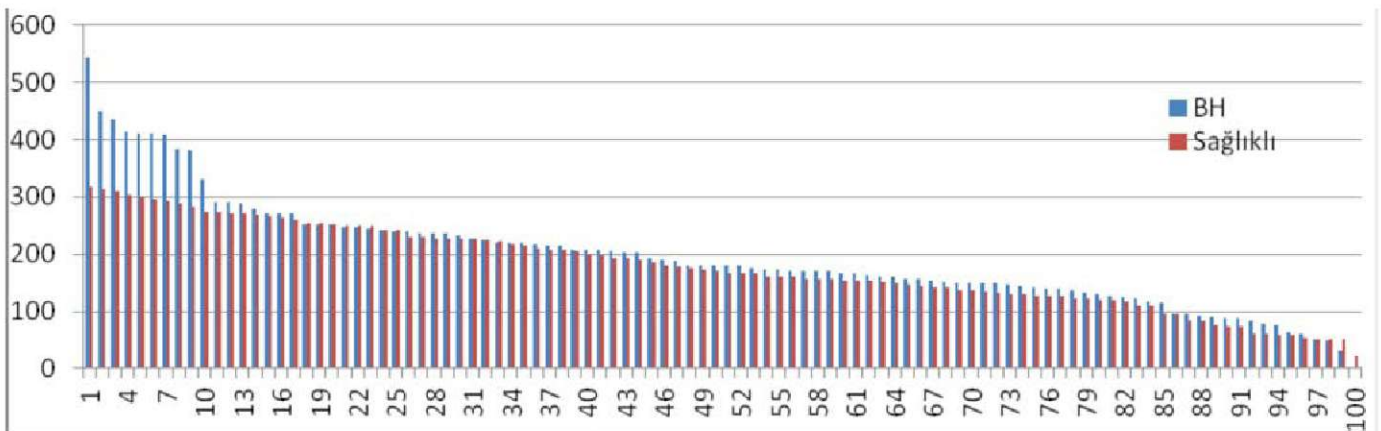
Tablo 2. ELISA ile SEREX sonuçları arasındaki benzerlik oranları

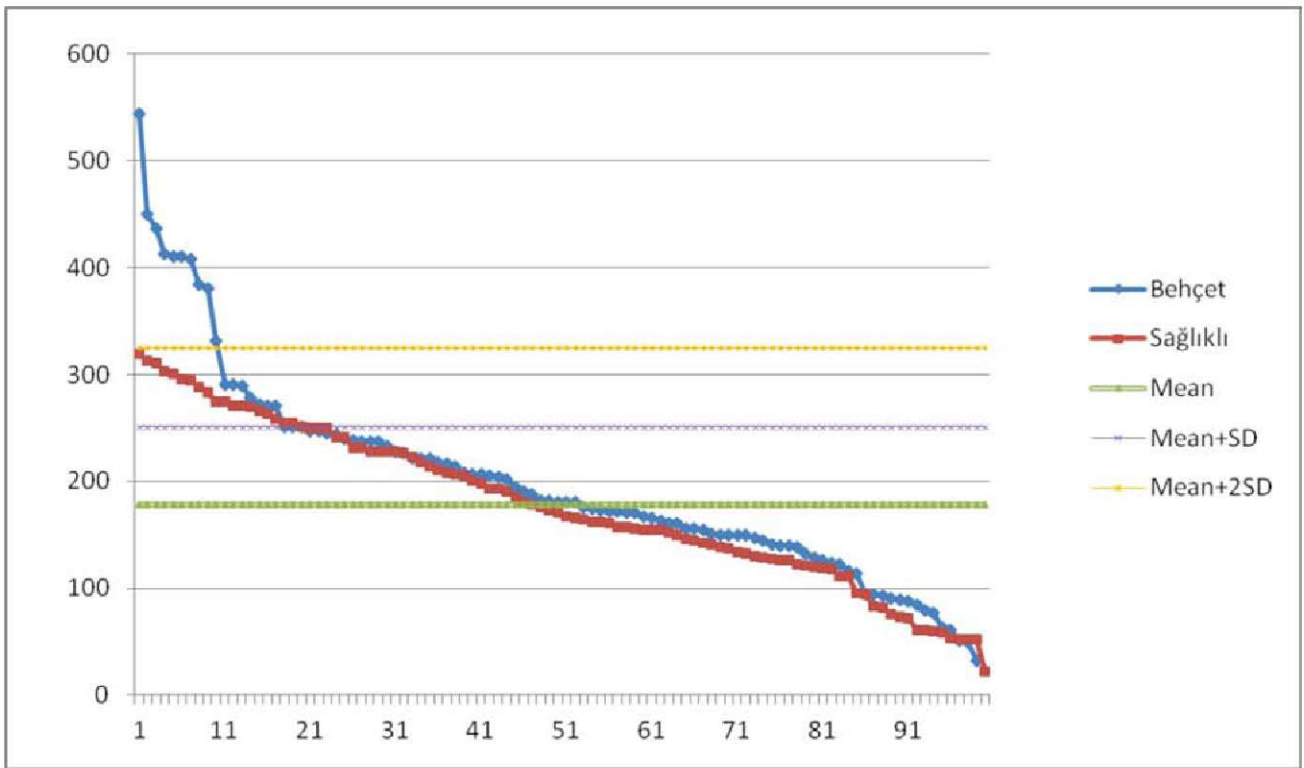
ELISA Ayrım noktası	Duyarlılık (%)	Özgünlük (%)	SEREX Benzerlik Oranı (%)
583	3	90	100
402	13	90	100
376	19	90	86
366	19	80	75
291	35	80	62

Bu çalışmada SWAP70 seroreaktivitesi Behçet hasta (n=99) ve sağlıklı kontrol (n=100) serum örneklerinde ELISA yöntemi ile araştırıldı. Sonuçlar, ham veriler ile değerlendirildi ve grafikte görülmektedir (Şekil 3). Hasta verileri, sağlıklı kontrollere göre daha geniş bir dağılım göstermekte ve en yüksek değerler sadece BH grubunda görülmektedir. BH ve sağlıklı kontrollerin ortalama değerleri sırasıyla 200 ± 95 ve 178 ± 74 şeklindedir. Tüm veriler unpaired t-test ile istatistiksel olarak analiz edildi ve her iki grup karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı olmasa da anlamlılığa yakın bulundu ($p=0,069$). Bu çalışmada anti-SWAP70 pozitif bireyleri belirleyebilmek için

SWAP70 antikor miktarının bilindiği bir standart bulunmadığından, ELISA verilerindeki standart sapma değerleri kullanılarak eşik değerleri belirledik. Buna göre ortalama, +SD, +2SD değerleri farklı seropozitiflikleri belirlemek için hesaplandı (Şekil 4). Grafikte görüldüğü üzere sağlıklı kontrol grubundaki en yüksek ELISA değeri, anti-SWAP70 pozitif ve negatif bireylerin ayırımı için bazal bir değer teşkil etmekte ve bu ayırım noktası da ortalama+2SD değerine denk gelmektedir. Bu eşik değer üzerinde sonuç veren bireyler anti-SWAP70 pozitif olarak kabul edildiğinde, 10 Behçet hastasının SWAP70 pozitif olduğu belirlendi.

Şekil 3. Behçet hasta (BH) ve sağlıklı kontrol serum örneklerindeki SWAP70 antikor yanıtı için ELISA verileri

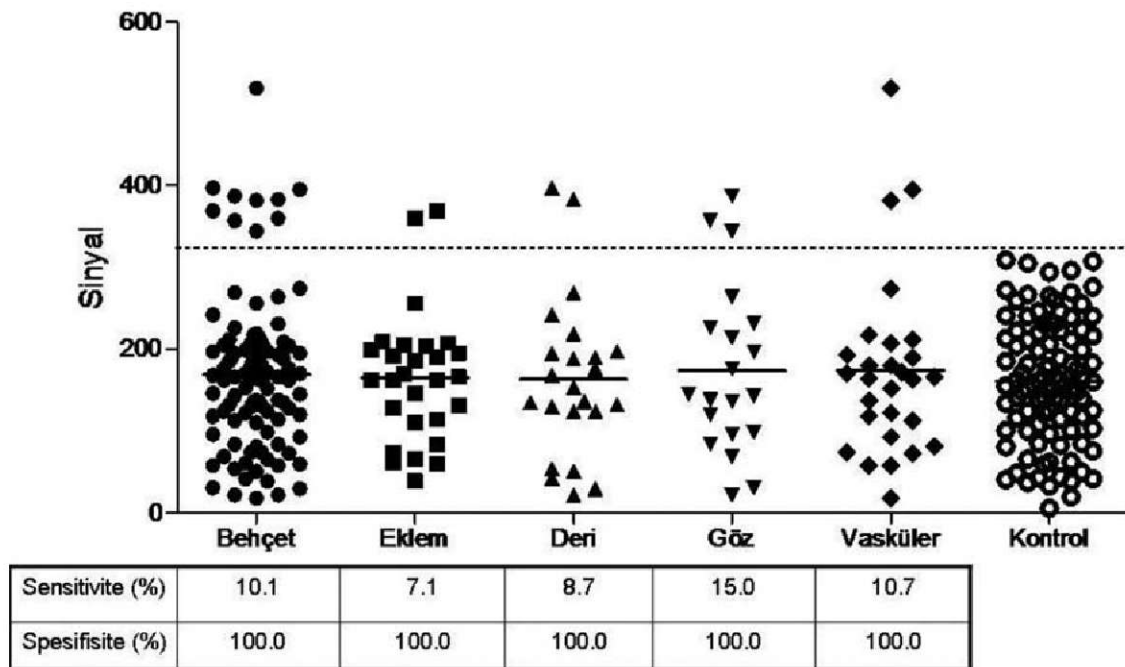




Şekil 4. Behçet hasta ve sağlıklı kontrollerdeki ELISA değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi.
Mavi: Behçet hastaları, **kırmızı:** Sağlıklı kontroller, **yeşil:** Sağlıklılarıdaki ortalama (mean),
mor: Sağlıklılarıdaki ortalama+SD, **sarı:** Sağlıklılarıdaki ortalama+2SD.

Bu çalışmada Behçet hastaları klinik özelliklerine 4 alt grupta kategorize edildi. Bu gruplar deri/mukoza tutulumu, eklem tutulumu (artrit), göz tutulumu (uveit) ve damar tutulumu (vaskülit) şeklindedir. Şekil 4'teki ortalama+2SD eşik değerine göre 10 Behçet hastası SWAP70 seropozitif bulundu. Bunların 2'si eklem, 2'si deri, 3'ü göz ve 3'ü vasküler tutulum

göstermektedir. Ayrıca SWAP70 seropozitifliğinin dağılımı, BH alt gruplarında da analiz edildi ve %100 spesifite değeri Şekil 5'te gösterilmiştir. SWAP70 antikor düzeyleri tüm Behçet hasta alt grupları arasında da ANOVA ile karşılaştırıldı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 5. SWAP70 antikoru için hastaların ELISA yöntemi ile elde edilen değerlerinin ve %100 spesifitede saptanan sensitivite değerlerinin Behçet hastalığı alt gruplarına göre dağılımı (kesik çizgi SWAP70 antikor pozitifliği için hesaplanan eşik değeri göstermektedir).

TARTIŞMA

Behçet Hastalığı (BH) bilinmeyen etiyojisi ile kronik inflamatuvar bir bozukluktur. En iyi bilinen patogenetik mekanizma, HLA-B gen polimorfizmleri ile ilişkili genetik yatkınlıktır. Diğer bulgular, enfeksiyöz ajanlar ve otoimmün mekanizmaların dahil olduğu çevresel faktörlerin patojenik rolü olduğunu göstermektedir. Behçet hastalarının serumunda birçok antijene karşı oluşan otoantikörlerin bulunması, immün kaynaklı yanıtı destekler niteliktedir (6).

Bugüne kadar BH'na spesifik olabilecek birçok aday otoantijen bulunmuştur. Behçet hasta serumunda artmış düzeyde serbest Hsp

70 ve anti-Hsp70 antikörlerinin bulunması, Hsp70 ilişkili immün yanıtların BH'daki doku yıkımında ve proinflamatuvar sitokin aktivasyonunda yer alabileceği bildirilmiştir (5). Başka bir çalışmada endotel hücre cDNA kütüphanesinin Behçet hasta serumu ile taranması sonucu Sip-1 C-ter alt birimine karşı seroreaktivite tespit edilmiş ve Sip-1 yeni bir otoantijen olarak gösterilmiştir (6). Ayrıca insan kinektin geninin klonlanıp farklı sistemlerde eksprese edilmesiyle, IFA deneylerinde antijen olarak kullanılmış ve Behçet hastalarında yüksek oranda anti-kinektin antikor tespit edilmiştir (7). Otoimmün üveitle ilişkilendirilen retinal S-antijeni ve alfa-enolaz, Behçet hastalarında da belirlenmiş ve ayrıca yeni bir retinal otoantijen adayı olarak Selenyum bağlayan protein (SBP) gösterilmiştir (8). Başka çalışmalarda anti-endotelial hücre antikor (AECA) Behçet hasta serumunda belirlenmiş ve IgG-AECA'nın ağır BH lezyonlarında bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (9). Behçet hasta doku lizatları ile yapılan bir çalışmada ise alfa-tropomyosine karşı antikor oluşumu gözlenmiştir (18).

Farklı teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı otoantijenler belirlenebilmektedir. SEREX yöntemi ile yapılan bir önceki çalışmamızda da insan testis cDNA kütüphanesi, Behçet hastalarının serum havuzunda taranmış ve PINK1 antijenine karşı olduğu belirlenen antikor yanıtı %13,4 sensitivite değeri ile BH'na spesifik olduğu belirlenerek yeni bir aday otoantijen olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada SWAP70 antijenine karşı oluşan antikor yanıtı, BH'na düşük spesifiklik göstermesine rağmen sensitivite değeri %22 ile PINK1'den daha yüksektir ve ayrıca hasta alt grup analizlerinde vasküler tutulum ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (11).

Bu çalışmada SWAP70 antijene karşı oluşan otoantikor yanıtı açısından, Behçet hasta ve sağlıklı kontrollerin ELISA sonuçları karşılaştırıldığında, hastalardaki seropozitivite (%10), kontrol grubundakine göre anlamlı bulunmuştur. Behçet hasta alt grupları, seropozitif ve seronegatif hastalar açısından ve belirli bir tutulumu olan/olmayan hastalar açısından değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. SEREX yöntemi ile yapılan önceki çalışmamızda vasküler tutulumlu hastaların %38,9'unda (n=7/18) SWAP70 seropozitivitesi gözlenmiş ve vasküler tutulumla ilişkili bulunmuştur. ELISA yöntemi ile yapılan bu çalışmada ise vasküler tutulumlu hastaların %10,7'sinde SWAP70 seropozitivitesi belirlenmiş ve çalışılan bütün alt gruplarda analiz edildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Ayrıca SEREX çalışmasında yer alan bir grup hasta ve kontrol örneği ELISA ile de değerlendirilmiştir. Buna göre çok yüksek ELISA değerlerinde SEREX sonuçlarının %100 paralellik gösterdiği görülmektedir fakat bu durumda sensitivite oram azalmaktadır. Yöntemler arasındaki teknik farklar göz önünde bulundurulduğunda SEREX kalitatif, ELISA ise

kantitatif bir yöntemdir. SEREX ile tespit edilen seropozitif bir örnek, ELISA değerlendirmesinde eşik değerinin altında kalabilir. Bu da bu çalışmada sağlıklı kontrollerde neden SWAP70 seropozitifliğinin belirlenmediğini açıklayabilir.

SWAP70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm (switch) bölgesi substratları arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (12). Timus ve kemik iliğinde zayıf bir şekilde eksprese olan SWAP70'in, dönüşüm (switch) için uyarılmış dalak hücrelerinde SWAP70 RNA'sının belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Dalaktan kemik iliğine transfer olan B hücrelerinin bu esnada apoptozu gerçekleşir; sadece %10-20'si hayatta kalır. Bu olayda dalaktaki B hücrelerinin SWAP70 eksprese edenlerinin seçildiği düşünülmektedir. B hücrelerinin aktivasyonu ile SWAP70, sitoplazmadan membrana doğru lokalize olur ve burada B hücre reseptörleri ile ilişki kurar. B hücre nükleusunda DNA tamir proteinleri de olmak üzere birçok proteinle etkileşime geçer. Bu yüzden SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu ve nükleer olayları aktive edebileceği, ayrıca membran ya da sitoplazma sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (15,16).

İmmün sistemde önemli fonksiyonları olan mast, dendritik ve B hücrelerinin aktivasyonlarında ve ilişkili sinyal ileti yollarında yer alan SWAP70, otoinflamasyon olaylarındaki hedef antijenlerden biri olabilir. Etiyojisi tam olarak bilinmeyen olayların tetiklediği otoantikörlerin, hedef antijenlere yönelik oluşumu, Behçet hastalarında daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Halen hastalığa özgü olabilecek otoantijenler belirlenmeye devam etmektedir. Bir önceki çalışmamızda SEREX yöntemi ile belirlediğimiz ve bu çalışmada ELISA ile seroreaktivitesini araştırdığımız SWAP70 antijeninin, BH patogenezinde rolü olabileceğini düşünmekteyiz. SWAP70 antijenine karşı gelişen otoantikörlerin, hastalığın farklı manifestasyonları (örneğin, vaskülit) ile ilişkisinin belirlenmesi, sadece BH'da değil, söz konusu manifestasyonu gösteren diğer hastalıklardaki rolünün belirlenmesini sağlayabilir. Bunun için daha geniş hasta populasyonlarında alt grup analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmadaki alt grup analizlerinde, sayı azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. Diğer bir önemli nokta, SWAP70 otoantijeninin BH'na özgünlüğünü kanıtlayabilmek için romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi başka otoinflamatuvar hastalıklarda da SWAP70 otoreaktivitesinin araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamız, SWAP70'in BH için yeni bir aday otoantijen olabileceği görüşü açısından önem taşımaktadır. İmmün sistemde farklı yollarında yer alan SWAP70, otoinflamasyon olaylarındaki hedef antijenlerden biri olabilir. SWAP70 seroreaktivitesinin, otoinflamatuvar manifestasyonlar gösteren diğer hastalıklarda ve daha geniş hasta populasyonlarında araştırılması, BH patogenezindeki rolünün ve bu hastalığa olan özgünlüğünün belirlenmesine yardımcı olacaktır.

Alınan destek: Bu proje İstanbul Üniversitesi BAP (BAP Proje No:3351) tarafından desteklenmiştir.

Kısaltmalar:

HSP	Isı şoku proteini
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
Th	T helper hücre
kD	Kilodalton
SD	Standart sapma

Kaynaklar

1. Özışık H. I., Altınayar S., Özcan A. C. Behçet Hastalığında Nörolojik Tutulum. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 12(4) 239-242.
2. Gül A. Behçet's disease: An update on the pathogenesis. Clin Exp Rheumatol 2001; 19 (Suppl. 24), S6-S12.
3. Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y. Role of gamma delta T cells in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. Lancet 1996; 347:789-94.
4. Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T. Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. Clin Exp Immunol 1994;97:226-31.
5. Birtaş-Ateşoğlu E., İnanç N., Yavuz S. Serum Levels of free heat shock protein 70 and anti-HSP70 are elevated in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 2008; 26(4 Suppl 50): S96-8.
6. Delunardo F, Conti E, Margutti P. Identification and characterization of the carboxyterminal region of Sip-1, a novel autoantigen in Behçet's disease. Arthritis Research & Therapy 2006; Vol 8, No 3, 1-8.
7. Feng XG., Ye S., Lu Y. Antikinectin autoantibody in Behçet's disease and several other autoimmune connective tissue diseases. Clin Exp Rheumatol 2007; 25(4 Suppl 45), S80-5.
8. Okunuki Y., Usui Y., Takeuchi M., Kezuka T. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behçet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behçet's disease. Exp Eye Res. 2007; 84(5):823-31.
9. Souza RC, Lage L, Goldesntein-Schainberg C. Anti-endothelial cell antibodies and central nervous system involvement in Behçet's disease. Clinics (Sao Paulo). 2007;62(6):685- 90.
10. Zhao C., Yang P., He H. Retinal S-antigen Th1 cell epitope mapping in patients with Behçet's disease. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2009; 247, 555-560.
11. Vural B., Demirkan A., Uğurel E. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's Disease. Clin Exp Rheumatol 2009; Mar-Apr;27(2 Suppl 53):S67-72.
12. Borggreffe T., Masat L., Wabl M. Cellular, intracellular and developmental expression patterns of murine SWAP-70. Eur. J. Immunol. 1999; 29, 1812-1822.
13. Borggreffe T., Wabl M., Akhmedov A. T. A B-cell-specific DNA recombination complex. Journal of Biological Chemistry 1998; Vol 373, No 27, 17025-17035.
14. Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. J Biol Chem. 2004; 279: 8506-8515.
15. Pearce G., Angeli V, Randolph G.J. Signaling protein SWAP-70 is required for efficient B cell homing to lymphoid organs. Nature Immunology. 2006; 7, 827 - 834.
16. Wakamatsu I., Ihara S., Fukui Y. Mutational analysis on the function of the SWAP-70 PH domain. Molecular and Cellular Biochemistry 2006; 293, 137-145.
17. Cranenburgh R. M. An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. Applied Genetics and Molecular Biotechnology. 2004; s00253-004-1577-7.
18. Mahesh S. P. et al. Alpha tropomyosin as a self-antigen in patients with Behçet's disease. Clinical and Experimental Immunology. 2005; 140: 368-375.