

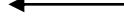
NILGÜN SALLAKCI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

Adınızı soyadınızı giriniz



Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



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

DOKTORA TEZİ

**BEHÇET HASTALIĞINDA AKTİVE EDİCİ DOĞAL
ÖLDÜRÜCÜ (NK) RESEPTÖRLER**

NİLGÜN SALLAKCI

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

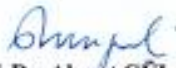
İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

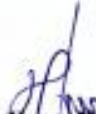
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programında Doktora öğrencisi Nilgün SALLAKCI tarafından Prof. Dr. Günnur DENİZ'in danışmanlığında hazırlanan "**Behçet Hastalığında Aktive Edici Doğal Öldürücü (NK) Reseptörler**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 20.12.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Günnur DENİZ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Prof. Dr. Hacer DİRESKENELİ
Marmara Üni. Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



Prof. Dr. Esin ÇETİN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Barbaros ORAL
Uludağ Üni. Tıp Fakültesi
İmmünoloji Anabilim Dalı

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.

Nilgün Sallakcı (İmza)



İTHAF



Babam ve Olcay Hocam 'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda sabır ve emeği için tez danışmanım Prof. Dr. Günnur Deniz'e, deneylerimde bana destek sağlayan Doç. Dr. Esin Aktaş Çetin'e, Doç. Dr. Umut Küçüksezer'e, Abdullah Yılmaz'a, tezimin yazım aşamasında desteği olan Msc. İlhan Tahralı'ya ve Dr. Yusuf Gelmez'e, klinik katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Gül'e teşekkür ederim. Manevi desteklerini ve yakınlıklarını esirgemeyen tüm Aziz Sancar DETAE, İmmünoloji Anabilim Dalı ekibine ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim sırasında vefat eden immünoloji alanına birlikte başladığım, doktora öğrenimine başlamak için beni teşvik eden hocam Prof. Dr. Olcay Yeğin'e ve hayatım boyunca emeği geçen babam'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 43303

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epidemiyoloji.....	3
2.2. Etyopatogenez.....	4
2.2.1. Genetik Faktörler	4
2.2.2. Enfekte edici ajanlar.....	6
2.2.3. Isı şoku proteinleri – (HSP’ler).....	6
2.3. Behçet Hastalığı ve İmmün Sistem İlişkisi	7
2.3.1. Behçet Hastalığı ve T Lenfositleri	7
2.3.2. Behçet Hastalığı ve NK Hücreleri	8
2.3.3. Behçet Hastalığı ve Nötrofiller	8
2.3.4. Behçet Hastalığı ve Sitokinler.....	8
2.4. NK Hücreleri.....	9
2.4.1. NK Hücre Efektör Fonksiyonları.....	10
2.4.1.1. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi	10
a. Perforin Aracılı NK hücre Sitotoksitesitesi.....	10
b. Ölüm Reseptörleri Aracılığıyla NK hücre Sitotoksitesitesi.....	10
2.4.1.2. NK Hücrelerinden Sitokin Salınımı	11
2.4.2. NK Hücre Aktivasyonu.....	12
2.4.2.1. Missing Self - Özün Kaybı Hipotezi	12

2.4.2.2. CD16 Aracılığıyla NK Hücre Aktivasyonu	12
2.4.2.3. Sitokinlerle NK hücre Aktivasyonu	12
2.5. Sitokinler.....	13
2.5.1. İnterlökin-12.....	13
2.5.2. İnterlökin-15.....	13
2.5.3. IL-18.....	14
2.5.4. IL-23.....	15
2.6. NK Hücre Reseptörleri	16
2.6.1. İnhibe Edici Reseptörler.....	16
2.6.2. Aktive Edici Reseptörler.....	16
2.6.2.1. NKp30.....	17
2.6.2.2. NKp44.....	17
2.6.2.3. NKp46.....	18
2.6.3. CD94/NKG2 Ailesi.....	19
2.6.4. NKG2D	19
2.7. T Lenfositleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Olgular	21
3.1.1. Behçet Hasta Grubu	21
3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu.....	21
3.2. Örneklerin Toplanması	21
3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	23
3.4. Çalışma Şeması.....	25
3.5. PKMH İzolasyonu	26
3.6. Hücre Kültürü ve Sitokinlerle Uyarım.....	27
3.7. Hücre Yüzey Boyama	27
3.8. NK Sitotoksiste Ölçümü	28
3.9. Proliferasyon Deneyi	28
3.10. CD107a Degranülasyon Deneyi	29
3.11. İstatistik.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T ve CD3 ⁻ CD16 ⁺ NK Hücrelerinde CD69, IL-12RB2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları.....	30

4.1.1. CD4 ⁺ T Lenfositlerdeki CD69, IL-12RB2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları	30
4.1.1.1. CD4 ⁺ Hücre Popülasyonunda CD69 Oranları.....	30
4.1.1.2. CD4 ⁺ T Hücre Popülasyonunda IL-12Rβ2 Oranı.....	32
4.1.1.3. CD4 ⁺ T Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Hücre Oranları	34
4.1.2. Behçet Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol Grubunda CD69, IL-12RB2, CD8 ⁺ NKG2D ⁺ , CD8 ⁺ NKp30 ⁺ ve CD8 ⁺ NKp46 ⁺ Hücre Oranları.....	38
4.1.2.1. CD8 ⁺ Hücre Populasyonunda CD69 Oranları.....	38
4.1.2.2. CD8 ⁺ T Hücre Popülasyonunda IL-12RB2 Oranları	39
4.1.2.3. CD8 ⁺ T Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları.....	41
4.1.3. Behçet Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol Grubunda CD3 ⁺ CD16 ⁺ NK Hücrelerinin CD69, IL-12RB2, CD3 ⁺ CD16 ⁺ , NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları.....	45
4.1.3.1. CD3 ⁺ CD16 ⁺ Hücre Populasyonunda CD69 Oranı	45
4.1.3.2. CD3 ⁺ CD16 ⁺ NK Hücre Populasyonunda IL-12RB2 Oranı.....	46
4.1.3.3. CD3 ⁺ CD16 ⁺ NK Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları	48
4.2. Behçet Hastalarında NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi.....	51
4.3. Behçet Hastalarında CD107a Degranülasyonu.....	53
4.4. Behçet Hastalarında Lenfositlerin Proliferatif Yanıtları	55
4.4.1. CD3 ⁺ CD56 ⁺ NK Hücre Proliferasyonu	55
4.4.2. CD3 ⁺ T Lenfosit Proliferasyonu	57
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	64
HAM VERİLER	80
ETİK KURUL KARARI	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan monoklonal antikorlar	23
Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan solüsyonlar	24
Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan gereçler	24
Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan cihaz ve yazılımlar	25
Tablo 3-6: Çalışmada kullanılan rekombinant sitokinler	25
Tablo 3-7: Hücre kültüründe kullanılan sitokin kombinasyonları ve dozları	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1: US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu $CD3^+$ T lenfosit kapısında $CD4^+CD69^+$ hücreler	31
Şekil 4.2: Aktif, inaktif ve kontrol gruplarında $CD3^+CD4^+CD69^+$ hücre oranları	32
Şekil 4.3: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucunda lenfosit popülasyonu içindeki $CD3^+CD4^+IL-12R\beta2^+$ hücreler	33
Şekil 4.4: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımlar sonucu hasta ve kontrol grubu lenfosit popülasyonlarında $CD3^+CD4^+IL-12R\beta2^+$ hücre oranları	34
Şekil 4.5: $CD3^+CD4^+$ T Lenfosit kapısında US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları	35
Şekil 4.6: PKMH'lerin US koşulda ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımları sonucu $CD3^+CD4^+$ T lenfosit popülasyonundaki NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları	37
Şekil 4.7: $CD8^+$ hücre kapısındaki $CD8^+CD69^+$ lenfositlerin akan hücre ölçer ile gösterimi	38
Şekil 4.8: $CD3^+CD8^+CD69^+$ hücre oranlarının gruplar arasında karşılaştırılması	39
Şekil 4.9: $CD3^+$ ve $CD8^+$ T hücre kapısı içinde farklı sitokin kombinasyonlarına yanıtta IL-12R $\beta2$ oranları	40
Şekil 4.10: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonrası $CD3^+CD8^+IL-12R\beta2^+$ hücre oranları	41
Şekil 4.11: $CD8^+NKG2D^+$, $CD8^+NKp30^+$ ve $CD8^+NKp46^+$ hücre oranlarının $CD3^+CD8^+$ T hücre kapısı içinde değerlendirilmesi	42
4.12: Behçet hastaları ve kontrol gruplarında $CD8^+NKG2D^+$, $CD8^+NKp30^+$ ve $CD8^+NKp46^+$ lenfosit oranları	44
Şekil 4.13: Akan hücre ölçer cihazında PKMH'lerin kapılama stratejisi ve $CD3^+CD16^+CD69^+$ hücrelerin analizi	45
Şekil 4.14: US koşulda ve farklı sitokinlerle uyarım sonrası $CD3^+CD16^+CD69^+$ hücre oranları	46
Şekil 4.15: $CD3^+CD16^+IL-12R\beta2^+$ hücre popülasyonunun akan hücre ölçer cihazında analiz görüntüleri	47
Şekil 4.16: $CD3^+CD16^+$ NK hücre grubunda farklı sitokinlerle uyarım sonrası IL-12R $\beta2$ oranları	48

Şekil 4.17: CD3 ⁻ CD16 ⁺ NK hücre popülasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 ifadesi	49
Şekil 4.18: Hasta ve kontrol gruplarında CD3 ⁻ 16 ⁺ NKG2D ⁺ , CD3 ⁻ 16 ⁺ NKp30 ⁺ ve CD3 ⁻ 16 ⁺ NKp46 ⁺ NK hücre oranları.....	51
Şekil 4.19: PKMH'lerin US durumda sitotoksik aktivitelerinin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi	52
Şekil 4.20: Aktif ve inaktif hastaları ile sağlıklı kontrol gruplarında sitotoksik aktivite	53
Şekil 4.21: Akan hücre ölçer cihazında CD107a analizinin değerlendirilmesi	54
4.22: Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında CD107a düzeylerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.23: Lenfosit (R1), CD3 ⁻ (R2) ve CD3 ⁺ (R3) hücrelerinin kapılama stratejisi	55
Şekil 4.24: Aktif, inaktif ve sağlıklı kontrol gruplarında CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK hücrelerinin sitokin uyarımları sonucu proliferatif yanıtları	56
Şekil 4.25: Hasta ve kontrol grupları proliferative kapasitelerinin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi.....	57
Şekil 4.26: Kontrol, inaktif ve aktif gruplarında CD3 ⁺ T lenfositlerin sitokin uyarımları sonucunda proliferatif yanıtlarının karşılaştırılması	58

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC: Allophycocyanin

BAT-3: HLA-B ile ilişkili Transkript-3

Bcl: B Hücre Lenfoma

BH: Behçet Hastalığı

CCL: C-C Kemokin Ligand 5

CCR: C-C Kemokin Reseptör

CD: Farklılaşım Kümesi (Cluster of Differentiation)

CFSE: Carboxifluorescein Succinimidil Ester

DH: Dendritik Hücre

FITC: Fluorescein İzotiosiyanat

FSC: Önden saçılım (Forward scatter)

FCS: Fetal Sığır Serum

GM-CSF: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

GWAS: Tüm Genom İlişkilendirme Çalışmaları (Genom-wide association study)

HLA: İnsan Lökosit Antijen

HSP: Isı Şoku Proteini

HSV: Herpes Simpleks Virüs

ICAM-1: Hücre-içi Adezyon Molekül-1

IFN α/β : İnterferon alfa/beta

Ig: İmmünoglobulin

IL: İnterlökin

ITAM: İmmün Reseptör Tirozin Bazlı Aktivatör Motif

ITIM: İmmün Reseptör Tirozin Bazlı İnhibitör Motif

JAK-2: Janus Kinaz-2

KIR: Öldürücü İmmünoglobulin Benzeri Reseptör

KLRC4: Öldürücü Hücre Lektin Benzeri Reseptör Ailesi C4

MICA: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi Sınıf I İlişkili Zincir

MHC: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi

mRNA: Haberci-Ribonükleik Asit

MIP 1: Makrofaj Enflamatuvar Protein 1

NCR: Doğal Öldürücü Reseptör

NK: Doğal Öldürücü

NKG2D: Doğal Öldürücü Grup 2D

PKMH: Periferik Kan Mononükleer Hücre

$\gamma\delta$:Gamma delta

PER-CP: Peridinin Chlorophyll Protein Complex

PE: Phycoerythrin

PBS: Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi

R: Reseptör

S. sanguis: Streptococcus sanguis

SSC: Yandan saçılım (Side scatter)

STAT: Sinyal İleten ve Aktivatör Transkript

TNF- α : Tümör Nekroz Edici Faktör- α

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

Th: Yardımcı T hücresi

ULBP: UL Bağlayan Protein

US: Uyarımsız

μ L: Mikrolitre

ÖZET

Sallakcı N. Behçet Hastalığında Aktive Edici Doğal Öldürücü (NK) Reseptörler. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Behçet hastalığı, etyolojisi bilinmeyen, tekrarlayan inaktif ve aktif dönemleriyle karakterize, kronik enflamatuvar bir hastalıktır ve genetik olarak yatkın bireylerde çevresel faktörlerin tetiklemesi sonucu immünolojik değişikliklere neden olmaktadır. Doğal Öldürücü Reseptörler doğal ve edinsel immün sistem hücreleri arasında köprü oluşturan, immün cevapları azaltabilen ya da tetikleyebilen reseptörlerdir. Behçet hastaları (aktif n= 7, inaktif= 7) ve sağlıklı bireylerden (n= 6) izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMH) IL-12, IL-15, IL-18 ve IL-23 sitokinlerinin farklı kombinasyonları ile uyarımını takiben CD4⁺, CD8⁺ ve CD16⁺ hücrelerde NKG2D, NKp30, NKp46, CD69 ve IL-12Rβ2 oranları saptanmış, fonksiyonel açıdan proliferasyon kapasiteleri, sitotoksik aktiviteleri ve CD107a ifadesi akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir.

Çalışmamızda, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde CD69 ifadesi uyarımsız aktif Behçet hasta grubunda inaktif gruba göre yüksek saptanmıştır. Uyarımsız Behçet hastalarında CD8⁺NKp46⁺ hücre oranı, inaktif Behçet hastalarında hem aktif Behçet hastalarına hem de kontrol grubuna göre yüksek düzeyde saptanmıştır. Sitotoksik aktivite açısından gruplar arasında fark saptanmamıştır. Lenfositlerde CD107a degranülasyonu incelendiğinde, uyarımsız şartlarda aktif Behçet grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre CD107a ifadesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Lenfositler K562 ile uyarıldığında, CD107a ifadesi, inaktif Behçet grubunda kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. PKMH'lerin IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 and IL-23+IL-15 sitokin kombinasyonlarıyla uyarımı sonucu CD3⁺CD56⁺ NK (doğal öldürücü-natural killer) ve CD3⁺ T hücre proliferatif yanıtları inaktif Behçet hastalarında kontrol ve aktif Behçet hasta grubuna göre önemli derecede artış göstermiştir.

Bulgularımız, T hücrelerinde saptanan yüksek CD69, NK hücrelerinde gözlenen düşük CD107a ifadesi ve farklı sitokin kombinasyonlarına yanıtlar, T hücrelerine benzer şekilde NK hücrelerinin de Behçet hastalığının patogenezinde potansiyel rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, Sitokinler, NKR, Proliferasyon, Sitotoksiste

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 43303

ABSTRACT

Sallakci, N. (2017). Activating Natural Killer Receptors in Behcet's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute for Experimental Medicine, Department of Immunology, PhD Thesis. İstanbul.

Behcet's disease (BD) is a chronic inflammatory disease with unknown etiology, which is characterized by relapse and remission periods. Immunologic abnormalities triggered by environmental factors in genetically susceptible subjects underlies BD. Natural Killer Receptors expressed on innate and adaptive immune cells could initiate or amplify immune responses that can bridge these two arms. In this study, Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) isolated from BD patients (inactive n= 7, active n= 7) and healthy subjects (n= 6) were stimulated with IL-12, IL-15, IL-18 and IL-23 in various combinations. NKG2D, NKp30, NKp46, CD69⁺ and IL-12RB2⁺ expression on CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ cells were investigated. Proliferation capacity, cytotoxic activity and CD107a expression were determined by using flow cytometry.

In this study, increased CD69 expression on CD4 and CD8 T cells in remission group, in comparison with active patients were observed in unstimulated condition. Expression of CD8+NKp46⁺ cells were higher in remission group when compared with both active patients and controls, in unstimulated condition. CD107a expression was diminished in active group when compared with control group. In K562 stimulated lymphocytes, diminished CD107a levels were observed in remission group in comparison with healthy controls. Cytokine combinations including IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 and IL-23+IL-15, significantly increased proliferative capacity of CD3⁺CD56⁺ and CD3⁺ cells of Behcet's patients when compared with healthy subjects.

Our results suggest that high CD69, low CD107a expression observed in T cells and low CD107a expression in NK cells, and similar to T cells, suggest that NK cells may also play a potential role in the pathogenesis of Behçet's disease.

Key Words: Behcet Disease, Cytokines, NKR, Proliferation, Cytotoxicity

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 43303

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Patojenlere ve tümörlere karşı doğal öldürücü (Natural Killer - NK) ve T hücre yanıtları, NK ve T hücrelerinin yüzeylerinde ifade edilen çeşitli reseptör ligand ilişkisi sonucu gelişen sinyaller aracılığıyla düzenlenmektedir. T hücrelerinin antijen tanınması ve aktivasyonu, somatik rekombinasyonla oluşan antijen spesifik T hücre reseptörü aracılığıyla gerçekleşirken; NK hücreleri, birçoğu T hücre alt gruplarında da ifade edilen, genetik olarak kodlanmış geniş bir reseptör çeşitliliğini kullanmaktadır [1]. NK hücreleri kendi hücreleri üzerindeki değişikliğe uğrayan uyarı sinyallerini tarayarak aktive ve inhibe edici reseptörleri ile sağlıklı hücreyi hedef hücreden ayırt edebilmektedir [2]. Hücrel stres veya enfeksiyon durumlarında uyarı sinyalleri, NK hücreleri üzerindeki inhibe edici reseptörlerin azalması veya aktive edici reseptörlerin artmasıyla sonuçlanmaktadır. NK hücresi tarafından alınan sinyallerin dengesi, NK hücresinin aktive olup olmayacağını belirlemekte, inhibe edici sinyalin kaybı ya da aktif sinyalindeki bir artış NK hücre aktivasyona yol açmaktadır [3]. Stresin indüklediği aktive edici reseptör ligandlarındaki artış, tüm inhibe edici sinyalleri baskılayabilmekte ve NK hücre aktivasyona yol açmaktadır [4].

NK hücre aktivasyonu, bireyin kendi hücrelerine karşı kontrolsüz bir immün cevabın oluşmasını engellemek için sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenleme mekanizmalarından en önemlisi, NK hücrelerinin büyük doku uyumluluk kompleksi I (MHC-Sınıf I) antijenleri için inhibe edici reseptörler taşımasıdır [5]. NK hücrelerinin yüzeyindeki tek bir aktive edici reseptörün hedef hücre ligandına çapraz bağlanması, NK hücre fonksiyonlarını tetiklemek için yeterli olmamakta ve gerekli sinyal eşliğinin aşılması için aktive edici reseptörler arasında sinerji gerekmektedir [6-8]. Eşik değerin ancak aktive edici NK reseptörlerinin çapraz bağlanması ve sitokin uyarısı birlikte olduğunda aşılabilmesi, NK hücre regülasyonundaki önemini göstermektedir [9].

Aktive olmayan NK hücreleri periferik kanda, dalakta ve kemik iliğinde bulunmaktadır [10, 11]. Dendritik hücre (DH) kökenli sitokinlerinden interlökin (IL)-2, IL-12, IL-15, IL-18 ve interferon alfa/beta (IFN- α/β) NK hücrelerinin aktive olmalarında etkilidir [12-14]. Patojenlerle veya sitokinlerle aktive olan DH'ler ve NK hücreleri enflamasyon alanında etkileşmektedir. İki hücre arasındaki bu etkileşim, NK hücrelerinin yüzeyindeki NKp30 reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmekte, etkileşim

sonucunda olgun olmayan DH'ler lize edilmekte ve aynı zamanda IFN- γ salınımı başlamaktadır [15]. Aktive edici reseptörler, NKp30 ve NKp46'yı düşük miktarda ifade eden NK hücre klonlarının, antijen sunan hücreleri lize etme yeteneğinin azaldığı bilinmektedir. Antijen sunan hücrelerin NK hücre aracılı lizisi, doğal öldürücü reseptörlerin (natural cytotoxicity receptor - NCR) yüzey ifadesinin yoğunluğu ile korelasyon göstermektedir [16]. Ayrıca, insan NK hücrelerinin nötrofiller ile NKp46 aracılı etkileşimi sonucu, Fas aracılı mekanizma üzerinden nötrofil apoptozisine yol açtığı gösterilmiştir [17].

Kompleks bir enflamatuvar hastalık olan Behçet hastalığının (BH) etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, hastalığın patogenezinde anormal immün cevapların rolü olduğu bilinmektedir. Aktive T hücrelerinin sayısında artış saptanan çalışmaların yanında, BH'de NK hücrelerinin sayısında artışla birlikte NK hücre aktivitesinde düşüş olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [18-20]. Genetik çalışmalar, farklı genlerin (C-C motif kemokin reseptör 1 (CCR1), sinyal ileten ve activator transcript4 (STAT4), öldürücü hücre lektin-benzeri reseptör ailesi C4 (KLRC4), endoplazmik retikulum amino peptidaz 1 (ERAP1) ve IL-12 Reseptör (R) B2'nin BH patogenezinde etkili olduğuna ve sitotoksik mekanizmalarda görev aldığına işaret etmektedir [21].

Mevcut bilgiler ışığında gerçekleştirilen çalışmamızda, Behçet hasta ve sağlıklı kontrol periferik kan mononükleer hücre (PKMH) kültürüne doğal koşullarda DH'lerden salınan sitokinler farklı kombinasyonlarda eklenerek, NK ve T hücrelerinin aktive edici reseptör değişiklikleri ve proliferatif yanıtları incelenmiştir. Aynı zamanda NK hücrelerinin fonksiyonel kapasitesi hasta ve sağlıklı kontrollerde CD107a (cluster of differentiation - farklılaşma grubu 107a) ifadesi ve sitotoksik aktivite ölçümü ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

BH, ilk olarak 1937 yılında bir dermatolog olan Hulusi Behçet tarafından, oral ve genital ülserler ile üveitin birlikteliği olarak tanımlanmıştır [22]. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda Behçet hastalığının vasküler, artiküler, gastrointestinal, nörolojik, ürogenital, pulmoner ve kardiyak sistemleri içeren farklı organ tutulumlarının da görüldüğü, multisistem kronik bir hastalık olduğu belirlenmiştir [23].

BH inaktif (gerileme) ve aktif (alevlenme) dönemleri ile seyretmektedir ve bu dönemlerin süre ve sıklığı öngörülememektedir [24]. Hastalığın klinik seyri bilinmemekle birlikte deri, mukoza ve organ tutulumlarıyla önemli morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır [25].

BH tanısı için kullanılan spesifik bir laboratuvar bulgusu bulunmamaktadır [26]. Hastalığın aktif fazı boyunca C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı, periferik lökositler ve trombosit sayısı gibi enflamatuvar parametrelerde artış gözlemlenmektedir [27].

2.1. Epidemiyoloji

BH, Akdeniz'den Uzakdoğu'ya kadar uzanan ve tarihî İpek Yolu olarak adlandırılan bölgelerde yaygın olarak görülmesine karşın Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde nadir olarak görülmektedir [21, 28, 29]. Hastalığın prevalansı Türkiye'de 80-370 / 100.000, Japonya'da 30,5 / 100.000, Suudi Arabistan'da 20 / 100.000, İran'da 16,7 / 100.000 ve Çin'de 14 / 100.000 olarak bildirilmiştir [30].

Hastalık genellikle yaşamın ikinci ya da üçüncü dekatında (25-35 yaşları arasında) ortaya çıkmakla birlikte, erken ya da geç başlangıçlı hastaların da olduğu bildirilmiştir [31]. BH çocukluk çağında veya 50 yaşın üzerinde nadir görülmekte ve çocukluk döneminde ya da geç dönemde başlayan hastaların kliniği göreceli olarak kötü seyretmektedir [32].

BH, Orta Asya ve Akdeniz ülkelerinde erkeklerde daha sık görülürken, Japonya ve Kore'de kadınlarda daha sık gözlenmektedir [33, 34].

2.2. Etyopatogenezi

BH'nin etyopatogenezi tam olarak açıklanamamasına karşın çeşitli çalışmalar, genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel faktörlerin etkisi ile (enfeksiyöz ajanlar, çevre kirliliği, v.b.) hastalığın tetiklenebileceğini göstermektedir [29].

2.2.1. Genetik Faktörler

Farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalar, BH için en güçlü genetik yatkınlık faktörünün kromozom 6p21 üzerinde bulunan İnsan Lökosit Antijen B (HLA-B)*51 alleli olduğunu göstermektedir [35]. Behçet hastalarında HLA-B*51 allelinin görülme sıklığı % 40-80 oranında değişmektedir [36]. Hastalarda HLA-B*51 alleli görülme sıklığının toplumdaki sağlıklı bireylere göre % 60 oranında daha fazla olduğu bildirilmiştir [37].

BH'nin yaygın olduğu ülkelerdeki hastalarda HLA-B*51 allelini taşıma sıklığı Avrupa kökenli hastalara göre daha yüksek iken, İtalya ve Portekiz'dekilere benzerlik göstermesi B*51 prevalansının bölgesel farklılığını yansıtmaktadır. İtalya ve Portekiz'de BH prevalansının düşük (2 / 100.000) olarak belirlenmesi, BH gelişiminde HLA-B*51 allelinden başka faktörlerin de rol oynayabileceğini göstermektedir [38]. HLA-B*51 allelinin BH patogeneziye katkısının % 20 oranında olduğu bildirilmesine karşın, HLA-B*51 ile ilişkili patojenik mekanizma açıklık kazanmamıştır [39].

Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi-Sınıf I ilişkili zincir A (MICA), BH patogeneziinde aday bir gen olarak gösterilmiştir [40]. MICA geni, HLA-B geninin 46kb sentromerinde lokalize olmuştur [41]. Stresle uyarılabilen bir antijen olan MICA; NK, $\gamma\delta$ T ve CD8⁺ T lenfositlerinde bulunan Doğal Öldürücü Grup 2D (NKG2D) reseptörü ile etkileşerek doğal ve edinsel immün cevapların gelişiminde rol oynamaktadır [42]. Behçet hastalarında MICA-A6 allelinin görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir [43].

MHC bölgesi dışında BH ile ilişkiyi açıklayan bir genetik yatkınlık çalışması olan "Tüm Genom İlişkilendirme Çalışmaları"- "Genom Wide Assosiation Study" (GWAS) çalışmalarının en önemli bulgularından biri ERAP1, IL-10, IL-12RB2-IL-23R bölgesi, IL-12A, CCR1 ve STAT-4 gibi immün komponent lokuslarının BH ile birliktelik göstermesi olarak belirlenmiştir [44].

Güncel çalışmalar BH için yatkınlık faktörü olarak ERAP1 geninin rolü olduğunu göstermektedir [21,45]. ERAP1, endoplazmik retikulumda proteozom kökenli

peptidlerin HLA-Sınıf I'e yüklenebilmesi için peptitlerin N-terminal ucunun kesiminden sorumlu bir enzim olan amino-peptidazı kodlayan bir gendir [46]. HLA-Sınıf 1 moleküllerine peptid bağlanma afinitelerinin ve sunduğu peptid repertuarının farklı ERAP1 izoformlarının etkisi ile değişebildiği bildirilmiştir [47].

Japon hastalarda yapılan bir çalışmada immün yanıtın kontrolünde rolü olan IL-10 sitokinini kodlayan genin başlatıcı bölgesindeki iki farklı polimorfizmin (rs1800871 ve rs1800872) BH'ye yatkınlık ile güçlü birlikteliği gösterilmiştir [48]. Diğer bir çalışmada, bazı hastalarda IL-10 geninin intronik bölgesinde gözlenen rs1518111 polimorfizminin daha düşük IL-10 üretimine yol açtığı belirlenmiştir [49].

Türk ve Japon BH gruplarını içeren diğer bir GWAS çalışmasında, IL-23R - IL-12RB2 genleri arasındaki intergenik bölgenin hastalıkla bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir [48]. IL-23R ve IL-12RB2 birbirine yakın genlerdir ve düzenleyici bölgeleri paylaşmaktadırlar [50]. Türk hastaların GWAS analizinde IL-23R - IL-12RB2 genleri arasındaki bir intergenik bölgede rs924080 polimorfizminin BH ile birlikteliği gösterilmiştir [49]. IL-23R geninde düşük sıklıkta gözlenen yanlış anlamlı varyantların, reseptörün IL-23 uyarımına daha az yanıt vermesine neden olarak BH yatkınlığına karşı koruyucu rol oynadığı kabul edilmektedir [51].

KLRC4, doğal öldürücü gen kompleksi bölgesi olan 12p13 bölgesinde lokalize olmaktadır [52]. Tüm genom bağlantı analizinde bu bölge en güçlü bağlantı pikini sergilemektedir [53]. KLRC4, NK hücrelerinde ifade edilmektedir ve fonksiyonu henüz net olarak ortaya konmamıştır. KLRC4 geninde gözlenen bazı polimorfizmlerin (rs2617170) BH'ye yatkınlıkta risk faktörü olduğu gösterilmiş ve polimorfik alleli taşıyanların koruyucu alleli taşıyanlara göre NK hücre aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir [54].

BH ve HLA-B*51 geniyle yakın ilişkili Tümör Nekroz Edici Faktör-alfa (TNF- α) arasındaki bağlantı araştırılmış ve TNF- α -1031C allelinin BH'ye yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [55]. Ayrıca IL-1, IL-12, IFN- γ ve Transform Edici Büyüme Faktörü-beta1 (TGF- β 1) gen polimorfizmlerinin BH'nin patogenezi ile ilişkili olabileceği saptanmıştır [56, 57].

BH'nin epigenetiği üzerine yapılan çalışmalarda, IRS elementlerinin metilasyon seviyesindeki değişikliklerin, histon modifikasyonları, miR-182 ve miR-

3591-3p'nin up-regülasyonu, miR-155, miR-638 ve miR-4488'in down-regülasyonunun hastalığın patogenezindeki rolü gösterilmiştir [58].

2.2.2. Enfekte edici ajanlar

Herpes simpleks virüs (HSV) ve *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), BH patogenezinde rolü olduğu düşünülen çevresel tetikleyici ajanlar olarak kabul edilmektedir [26]. BH etyopatogenezinde streptokoklar ve HSV başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların rol oynadıkları gösterilmiştir [59].

Behçet hastalarında görülen oral sağlığın bozukluğu hastalığın şiddetiyle ilişkilendirilmiştir [60]. Oral floranın ve dental enfeksiyonların sık karşılaşılan bakterileri olan streptokok türü bakteriler BH'de sıklıkla çalışılmıştır. Hastaların oral floralarında *S. sangius* oranında gözlenen artışın diş çürükleri ve periodental enfeksiyonlar ile arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir [61]. Bakteriden arındırılmış farede oral travma sonrası *S. sangius*'un BH'dekine benzer şekilde oral ve oküler enfeksiyonları tetiklediği gösterilmiştir [62].

Hastalardaki immün hiperreaktivite nedeniyle, BH patogenezinde streptokokların immün hücreleri tetiklemedeki rolü araştırılmıştır [63]. *S. sangius*'un bir serotipi olan BES-1 geni tarafından kodlanan KTH-1 proteinin hastaların periferik kan T hücreleri tarafından üretilen IL-6 ve IFN- γ 'nın salınımını uyardığı ve $\gamma\delta$ T hücrelerini tetiklediği gösterilmiştir [64]. Aynı zamanda KTH-1 proteini ile insan intraoküler peptidinin amino asit dizilimleri arasındaki benzerlikler, hastalarda oto-reaktif cevap oluşabileceğini ortaya koymaktadır [65]. Streptokokal antijenlere ek olarak, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'un hastaların lenfositlerinde IL-6 ve IFN- γ üretimini arttırdığı bildirilmiştir [66]. Behçet hastalarında HSV1'e ve gastrointestinal tutulum gözlenen hastalarda *Saccharomyces cerevisiae*'ye özgü antikor düzeylerinin serumda arttığı gösterilmiştir [67].

2.2.3. Isı şoku proteinleri – (HSP'ler)

Isı şoku proteinleri (Heat shock protein - HSP); çeşitli stres faktörleriyle indüklenebilen, hücresel proteinlerin degradasyonu ve denatürasyonunu engelleyerek hücreleri erken ölümden koruyan, genetik olarak oldukça korunmuş moleküllerdir [68]. Non-spesifik uyarılara maruz kalındığında üretilen HSP60 ve HSP 65 antijenlerinin BH patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir [69].

Behçet hastalarının mukokutanöz lezyonlarında ve intestinal tutulumlu aktif dönemde olan hastaların periferik kan lenfositlerinde HSP60 ifadesinin arttığı gözlenmiştir [69, 70], ayrıca mikobakteriyal ve insan HSP kökenli peptidlere karşı gelişen lenfoproliferatif cevapların sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [71]. İnsan HSP60 antijeninin spesifik bir epitopunun, hastaların periferik kan lenfositlerini uyararak Th1 tipi sitokinlerin üretimini arttırdığı saptanmıştır [72].

İnsan HSP60 ile bakteriyel HSP65 moleküllerinin gen dizilimleri arasında yüksek oranda homoloji olduğu (mikobakteriyal HSP65 ile yaklaşık % 60 ve streptokokal HSP65 ile % 90) belirlenmiştir [73]. Mikrobiyal HSP65 ve insan HSP60 moleküllerinin gen dizilimleri arasındaki homoloji, hastaların oral mukozası ve mikrobiyal antijen arasındaki çapraz reaksiyonun proenflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında tetikleyici olabileceğini düşündürmektedir [74, 75].

2.3. Behçet Hastalığı ve İmmün Sistem İlişkisi

2.3.1. Behçet Hastalığı ve T Lenfositleri

BH patogeneğinde rol oynayan immünolojik anormallikler; artan $\gamma\delta$ T hücreleri, nötrofil hiperfonksiyonu, sitokinlerin aşırı üretimi ve artan T hücre yanıtları ile ilişkilendirilmiştir [76].

BH immünopatogenezinin ana karakteristiği yardımcı T hücre (T helper - Th)1 immün polarizasyonudur. Aktif fazdaki hastaların periferik Th1 hücre sayılarının ve T-bet ifadelerinin artışı, immün cevabın Th1 yönüne kaydığını göstermektedir [77, 78]. Aktif dönemdeki hastaların periferik kanlarında ve lezyonlarında Th1 tipi sitokin seviyelerinde artış bulunmuştur [79]. Behçet hastalarında $CD4^+$ / $CD8^+$ hücre oranında azalma olduğu gösterilmiştir [80].

Th17 hücreleri, birçok enflamatuvar ve otoimmün hastalıkta arttığı gösterilen yardımcı T hücre alt grubudur [39]. Behçet hastalarında Th17 hücrelerinin sayısı ve Th17 hücreleri tarafından üretilen IL-17 düzeyindeki artışın enflamasyondan sorumlu olduğu ve hastalığın akut ataklarında önemli rol oynadığı saptanmıştır [81, 82].

$\gamma\delta$ T hücreleri, bakteriyel antijenleri tanıyarak enflamasyona karşı cevap oluşturmakta ve otolog antijenleri tanıyarak otoimmünitede rol oynamaktadır [83]. Mukozal immünitede görev yapan $\gamma\delta$ T hücrelerinin, mukozal lezyonların eşlik ettiği BH patogeneğinde de rol oynadığı düşünülmektedir [84]. Behçet hastalarının mukozal

lezyonlarında ve dolaşımında aktif $\gamma\delta$ T hücrelerinin sayısının ve sitotoksik aktivitelerinin arttığı, ayrıca hastalığın aktivitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [85]. Behçet hastalarında $\gamma\delta$ T hücre alt grupları üzerine yapılan bir çalışmada, üveitli hastaların intraoküler sıvılarında V γ 9V δ 2 alt grubunda, başka bir çalışmada ise CD8⁺ $\gamma\delta$ T hücrelerinde artış olduğu gösterilmiştir [18, 86].

2.3.2. Behçet Hastalığı ve NK Hücreleri

Behçet hastalarında NK hücre sayıları üzerine yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar aktif dönemdeki hastaların periferik kanlarındaki NK hücre sayısının arttığını, bazı çalışmalar ise azaldığını göstermektedir. Aktif dönemdeki BH periferik kan NK hücre aktivitesinde ise sağlıklı kontrollere göre azalma olduğu gösterilmiştir [19].

2.3.3. Behçet Hastalığı ve Nötrofiller

BH patogenezinde nötrofil hiperfonksiyonunun (endotelyal adezyon, kemotaksis, fagositoz, süperoksit üretimi, miyeloperoksidaz ifadesi) doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir [87]. Antijen sunan hücreler ve T hücrelerinden salgılanan sitokinler nötrofilleri aktive ederek sitokin salınımını uyarırlar. Nötrofillerden salgılanan sitokinler hem Th hücrelerini hem de otokrin etki ile kendilerini uyarmaktadırlar. Antijen sunan hücreler, nötrofiller ve Th hücreleri arasındaki bu ilişki BH patogenezinde immün cevabın temelini oluşturmaktadır [88]. Behçet hastalarının deri lezyonlarında da nötrofil infiltrasyonunda artış gösterilmiştir [89].

2.3.4. Behçet Hastalığı ve Sitokinler

Farklı hücrelerden salınan proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 ve TNF- α) BH serumlarında yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir [90]. İmmünolojik olarak uyarımı takiben aktifleşen hücrelerin, özellikle nötrofillerin, proenflamatuvar sitokinleri üretebilmelerine karşın bu sitokinlerin büyük kaynağı, hastalıkta kronik enflamasyonun patogenezinde rol oynayabilen monositlerdir [91].

Hastaların periferik kanlarında Th1 farklılaşmasını uyaran IL-12'nin yükselmiş olduğu ve hastalık aktivitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [78]. Aktif dönemdeki hastaların lezyonlarında ve periferik kanlarındaki mononükleer hücrelerde kemokin ve Th1 tipi sitokinlerin haberci-ribonükleik asit (mRNA) ve protein üretimlerinde artış olduğu bildirilmiştir [70, 92, 93].

Behçet hastalarının “eritema nodozum” deri lezyonlarında IL-4 üreten hücrelerin nadir olarak bulunmasına karşın, IFN- γ üreten hücrelerde artış olduğu belirlenmiştir [94]. Hastalarda IFN- γ ’nın serum seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ancak hastalık aktivitesiyle ters orantılı olduğu gösterilmiştir [95].

IL-23, BH patogenezinde rol oynayan bir sitokindir ve hastaların serumunda IL-23 düzeylerindeki artışın hastalık aktivitesiyle, özellikle üveit ve nöro-Behçet ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [96].

Aktif dönemindeki Behçet hasta serum IL-15 seviyesinin, inaktifteki hastalara ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [97]. CD8⁺ $\gamma\delta$ T hücrelerinin yüksek seviyede IFN- γ , düşük seviyede IL-2, IL-4, IL-10 ve TGF- β salgıladığı gösterilmiştir [98].

2.4. NK Hücreleri

Doğal immün sistem hücreleri yüzeylerinde, patojenler üzerindeki ortak yapıları tanıyan reseptörleri ifade etmekte [99] ve tanıma reseptörleri aracılığıyla yabancı organizmalara karşı hızlı ve genel bir cevap oluşmasını sağlamakla birlikte, salgıladıkları sitokinler ve hücre yüzey moleküllerinin etkileşimi ile edinsel immün yanıtları başlatma, yönlendirme ve çoğaltma yeteneğindedirler [100].

Doğal immün sistem hücreleri arasında yer alan NK hücreleri 1970’li yılların ortalarında, allogenik tümör hücrelerini direkt lize etme yeteneğine dayanılarak yeni bir hücre tipi olarak tarif edilmiştir [101]. NK hücrelerinin gelişimi, fonksiyonu ve düzenlenmesi konusundaki geniş kapsamlı çalışmalar sonucunda, etkili doğal immün cevapların oluşmasında parazitlere, virüslere ve tümör hücrelerine karşı savunmada önemli rol oynadıkları belirlenmiştir [12].

T hücreleri gibi CD34⁺ ortak lenfoid öncül hücrelerden köken alan NK hücreleri gelişimlerini kemik iliğinde tamamlamaktadır [102]. NK hücreleri, T hücreleri gibi somatik rekombinasyona uğramamakta ve gelişimleri için fonksiyonel bir timusa ihtiyaç duymamaktadır [103]. Potansiyel olarak farklı fonksiyonel sonuçlar oluşturmalarına karşılık, NK hücre yüzey reseptörleri T hücreleri üzerinde de bulunabilmektedir [104].

İnsan PKMH popülasyonunun % 5-15’ini ve lenf nodlarındaki tüm lenfosit popülasyonunun % 5’ini oluşturan NK hücreleri karaciğer, dalak ve akciğerleri de içeren birçok dokuda bulunmaktadır [105]. İnsan NK hücreleri CD16 ve CD56 yüzey

gösterimlerine göre iki alt gruba ayrılmaktadır. Periferik kanda CD56 ifade eden NK hücre popülasyonunun yaklaşık % 90'ı CD56^{soluk}, % 10'u ise CD56^{parlak} fenotipi göstermektedir [106]. CD56 antijenini yüksek miktarda ifade eden CD56^{parlak} hücrelerin CD16 ifadesi çok düşüktür. CD56^{soluk} hücreler ise yüksek seviyede CD16 ifade ederken, CD56 ifadeleri düşüktür veya hiç bulunmamaktadır [107]. Fonksiyonel açıdan bakıldığında, CD56^{soluk} NK hücreleri başta tümör hücreleri olmak üzere virüs, bakteri ve mantarlarla enfekte hücrelerin lizisinden, CD56^{parlak} NK hücre alt grubu ise IFN- γ ve TNF- α gibi farklı sitokinlerin üretiminden sorumlu hücreler olarak bilinmektedir [10].

2.4.1. NK Hücre Efektör Fonksiyonları

NK hücrelerinin temel efektör görevleri; hedef hücreyi tanıdıktan sonra perforin aracılığıyla granül içeriklerini hedef hücre içerisine serbestleştirerek ya da ölüm reseptör ligandlarını ifade ederek hedef hücrenin öldürülmesini, sitokin sekresyonu ve kemokinler aracılığıyla diğer immün hücre tiplerinin enflamasyon alanına alımını ve aktivasyonunu sağlamaktır [108].

2.4.1.1. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi

a. Perforin Aracılı NK hücre Sitotoksitesi

NK hücrelerinin hedef hücreyi öldürme mekanizması sitotoksik T lenfositlerin öldürme mekanizmasına benzemektedir. Her iki hücre tipi de granüllerinde perforin, granzim ve granülizin gibi toksik enzimler içermektedir [109]. NK hücreleri hedef hücre ile etkileştiğinde, granül içeriğini hedef hücre yönüne doğru polarize etmekte, NK hücrelerinin dış membranı ile granüller bütünleşmekte ve granül içerikleri hedef hücre ile NK hücresi arasındaki sinaptik boşluğa serbestleştirilmektedir. Degranelasyon boyunca, lizozomla ilişkili membran proteini (CD107a), NK hücrelerinin yüzeyine iletilerek litik granüllerin hareketi kolaylaştırılmaktadır [110]. Granzimlerin, hedef hücre sitoplazmasına yayılabilmesi için perforin molekülü hedef hücre membranında bir delik formu oluşturmakta ve apoptotik işlemler başlatılmaktadır. Bu yol dakikalar içinde virüsle enfekte ve tümörle transforme olmuş hücrelerin hızlıca öldürülmesiyle sonuçlanmaktadır [111].

b. Ölüm Reseptörleri Aracılığıyla NK hücre Sitotoksitesi

NK hücreleri, ölüm reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerin ölümünü tetikleyebilmektedir. NK hücrelerinin büyük çoğunluğu ve sitotoksik T lenfositleri

yüzeylerinde sürekli olarak Fas ligandı (FasL) ifade etmektedirler. FasL hedef hücre yüzeyinde Fas molekülü ile etkileşime girmekte ve hedef hücrede kaspaz-8 yolağını aktive ederek hücrenin apoptozisine neden olmaktadır [112].

NK hücreleri, TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand ifade etmektedir. NK hücrelerinin sitokinlerle *in vitro* aktivasyonu, TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand ifadesinin artması ile sonuçlanmıştır [113].

2.4.1.2. NK Hücrelerinden Sitokin Salınımı

NK hücreleri enflamatuvar ve immünregülatör sitokinler üreterek immün cevapların oluşumuna katkı sağlamaktadır [114]. NK hücreleri yüksek seviyelerde IFN- γ üretmekte [115] ve salınan IFN- γ ; diğer immün hücreler, antijen sunan hücreler, virüsle enfekte ve malign hücreler üzerine pleotropik efektör etkiler göstermektedir. NK hücrelerinden IFN- γ üretimini tetikleyen birçok etken bulunmaktadır. NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan aktive edici reseptörler tarafından hedef hücrelerin tanınması NK hücrelerinden IFN- γ üretimini tetiklemektedir. Ayrıca viral enfeksiyonlarda üretilen IFN- α ile IL-12 veya IL-18'in sinerjistik etkisi sonucu NK hücreleri tarafından IFN- γ üretimi meydana gelmektedir [116].

NK hücreleri tarafından salgılanan diğer sitokin ve kemokinler (Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF), TNF- α , MIP-1a, MIP-1b ve C-C kemokin ligand-5 (CCL-5)) uyarımın tipine ve aktif sonrası süreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Erken enflamatuvar olaylarda çeşitli uyarılara karşı NK hücreleri tarafından üretilen sitokin tipine göre farklı immün cevaplar oluşmaktadır [117].

NK hücreleri sitokinler ve mitojenlerle uyarıldığında orta seviyede TNF- α üretmektedir [107]. NK hücre reseptörü NKp30'un olgun olmayan DH'ler ile bağlanması sonucu TNF- α üretimi tetiklenmekte ve DH olgunlaşmasına sebep olmaktadır [118]. Ayrıca TNF- α , hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ifadesini çoğaltarak NK hücre sitotoksitesini arttırmaktadır [119].

NK hücreleri tarafından yüksek seviyelerde üretilen GM-CSF, enfeksiyonlarla mücadelede granülositlerin hızlı üretimi için hematopoietik kök hücreleri uyarmaktadır. NK hücrelerinin IL-15 veya IL-12 / IL-18 sitokinleri ile uyarımı sonrası GM-CSF üretimi artmaktadır [107].

NK hücreleri belirli uyarılar varlığında IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinleri de üretmektedir [120, 121].

2.4.2. NK Hücre Aktivitesi

NK hücrelerinin aktivitesi; DH, monosit, makrofaj gibi hücrelerle ve sitokinlerle artırılabilir. Aktivitesi artan NK hücresinde, CD69 gibi aktif belirteçleri çoğalmakta, hücre içi granzim B içeriğinde ve NK hücre sitotoksik aktivitesinde artış meydana gelmektedir [122].

NK hücre aktivitesi, NK hücre reseptör sinyalinin yokluğunda, aktive edici NK hücre reseptörlerinin hedef hücreler üzerinde bulunan ligandlar ile bağlanması sonucu gerçekleşmektedir [2].

2.4.2.1. Missing Self - Özün Kaybı Hipotezi

NK inhibe edici reseptörleri için ligand olan MHC-Sınıf I moleküllerini ifade etmeyen ya da çok az ifade eden hücreler, NK hücreleri tarafından yabancı olarak algılanmaktadır [123]. NK inhibe edici reseptörlerinin uygun MHC-Sınıf I moleküllerine bağlanmaması, NK hücre sitotoksik fonksiyonlarının uyarılması ve sitokin salınımı ile sonuçlanmaktadır [124].

2.4.2.2. CD16 Aracılığıyla NK Hücre Aktivitesi

NK hücreleri, yüksek düzeylerde düşük afiniteli CD16 (Fc γ RIII reseptörü) ifade etmektedir. CD16, hücrelere Fab kısmı ile bağlanan immünoglobulin G (IgG)'nin Fc parçasına bağlanarak antikora bağımlı hücresel sitotoksikiteyi başlatmaktadır [125]. NK hücrelerinin CD16 aracılığıyla oluşan aktivasyon çok güçlü olmakla birlikte, NK hücre sitotoksikitesini NK hücre aktive edici reseptörler tetikleyebilmektedir [7].

2.4.2.3. Sitokinlerle NK hücre Aktivasyonu

Sitokinler; doğal ve edinsel immün sistem hücreleri tarafından sentezlenen, spesifik immün reaksiyonun ve enflamasyonun yoğunluğunu düzenleyebilen çözünür mediatörlerdir [126].

NK hücrelerinin gelişimi, aktivitesi, çoğalması ve yaşamında bazı sitokinler önemli rol oynamaktadır. Farklı sitokinler, NK hücre efektör fonksiyonlarını tetiklemektedir. NK hücrelerinin DH kökenli sitokinler (IL-12, IL-15 ve IL-18) ve T hücre kökenli sitokin (IL-2) ile uyarımı, yüksek seviyede IFN- γ üretimine yol

açmaktadır [127]. Ayrıca NK hücreleri özellikle ortak γ zincir sitokin ailesinden IL-2, IL-7, IL-15 and IL-21 için farklı bağlanma afiniteleri olan çeşitli sitokin reseptörleri ifade etmektedir [128].

2.5. Sitokinler

2.5.1. İnterlökin-12

IL-12, p35 ve p40 alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir sitokindir ve NK uyarıcı faktör olarak da adlandırılmıştır [129].

IL-12, makrofajlar ve DH'ler gibi antijen sunan hücreler tarafından salınmakta ve hem doğal hem de edinsel immün sistem hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlemektedir. Ayrıca TNF- α , GM-CSF ve Th1 hücre farklılaşmasını sağlayan IFN- γ 'nın üretimini de uyarır. IL-12'nin NK hücre gelişim ve farklılaşmasında da rol oynadığı gösterilmiştir [130].

IL-12R, IL-12R β 1 and IL-12R β 2 olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır [131]. NK hücreleri ve dinlenen T hücreleri sürekli olarak IL-12R β 1 ifade etmektedirler. IL-12R β 2 gösterimi ise sitokinlerle tetiklenmektedir [132]. IL-12'nin IL-12R β 1 ve IL-12R β 2 alt üniteleri ile etkileşimi Tyk2, Janus Kinaz (JAK)-2 ve STAT yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır [133]. IL-12, temel olarak T ve NK hücre fonksiyonları için önemli olan STAT4 sinyal yolağını aktive etmektedir [134].

2.5.2. İnterlökin-15

IL-15, hem doğal hem de edinsel immün sistemin hücreleri üzerinde güçlü yaşamsal ve immünmodülatör etkileriyle bilinen, geniş spektrumlu bir sitokindir [135]. Monosit, makrofaj, DH, fibroblast, epitel hücreleri ve düz kas hücrelerinde ifade edilmektedir [136]. IL-15 gösterimi transkripsiyonal, translasyonel ve sekresyon aşamalarında sıkı bir şekilde düzenlenmektedir [137]. IL-15 üretimi çeşitli eksojen faktörler (çift zincirli RNA, Tip I IFN, lipopolisakkaritler, HSV, sinsisyal virüs, çeşitli fungal ve bakteriyel ajanlar) ile tetiklenmektedir [138-140].

IL-15'in T, B, NK hücreleri, nötrofiller, monositler, makrofajlar, DH'ler ve mast hücreleri üzerinde etkileri bulunmaktadır [141]. NK hücre gelişimi, proliferasyon, homeostaz ve sitotoksikite gibi ana fonksiyonlarından sorumlu bir sitokindir [142-144]. CD8⁺ T ve NK hücrelerinde direkt olarak efektör fonksiyonların meydana gelmesine neden olmaktadır [145]. Hafıza CD8⁺ T hücrelerinde ise granzim B ifadesini arttırdığı,

aktive CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı, ayrıca CD8⁺ hafıza T lenfosit cevaplarının uzamasına da katkı sağladığı gösterilmiştir [146].

IL-15, ağırlıklı olarak bir anti-apoptotik gen olan B hücre lenfoma 2 (Bcl-2)'yi artırarak NK hücre yaşamını ve çoğalmasını tetiklemektedir [144]. Lenfositlerde ve DH'lerde de anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL'nin güçlü tetikleyicisidir. Dolayısıyla bu hücrelerdeki ifadesi, IL-15'in apoptojenik uyarılara cevabını çok azaltmaktadır [147].

IL-15; α , β ve γ alt gruplarından oluşan heterotrimerik bir reseptöre bağlanır. IL-15 için α alt grubu spesifiktir; β ve γ alt grupları ise IL-2 reseptörüyle paylaşılmaktadır [148]. IL-15R α , IL-2/15R β ve IL-2/15R γ ile yüksek afiniteli bir üçlü reseptör kompleksi oluşturabilmektedir [149].

2.5.3. IL-18

IL-18, IL-1 sitokin ailesinin bir üyesidir. "IFN- γ indükleyici faktör" olarak da isimlendirilmiştir [150]. Fareye endotoksin uygulanmasından sonra fare serumunda IL-18 saptanmış ve IL-12 ile benzer özellikler paylaştığı bulunmuştur [151]. IL-18 inaktif bir öncül olan pro-IL-18 olarak hücre içinde depolanmakta ve biyolojik olarak aktif forma Kaspaz-1 aracılığıyla dönüştürülerek hücre dışına serbestleştirilmektedir [152].

Makrofajlar ve DH'lerden serbestleşen IL-18, T hücreleri ve NK hücrelerinden IFN- γ üretimini tetiklemektedir [153]. Ancak güçlü bir Th1 cevabının oluşması için IL-18 tek başına IFN- γ salınımını tetikleyemediğinden, IL-12 veya IL-15 ile birlikte hareket etmektedir. Ayrıca IL-18, NK hücreleri tarafından adezyon moleküllerini ve kemokin reseptörlerini arttırmaktadır [154]. IL-18, NK hücreleri üzerinde FasL ifadesini çoğaltarak NK hücre sitotoksitesini arttırmaktadır [155]. IL-18 ile aktive olan NK hücreleri henüz IFN- γ sekrete etmemesine rağmen, CCR7 gösteriminin tetiklenmesi sonucu lenf nodlarına göç etmekte ve lenf nodlarında IFN- γ salımı uyarılmaktadır [155].

IL-18R, IL-18R α and IL-18R β alt gruplarından oluşmaktadır [156]. IL-18R'nün gösterimi IL-12 ile düzenlenmekte ve IL-12, IL-18R α 'nın tetiklenmesini sağlamaktadır [157]. IL-18 ise IL-12RB2'nin gösterimini arttırdığından iki sitokinle uyarım pozitif bir döngü sağlamaktadır. NK hücreleri sürekli olarak IL-12RB2 ve IL-18R α ifade ettiği için, her bir sitokinle bağımsız olarak uyarılabilmektedir [158].

2.5.4. IL-23

IL-23, IL-12 sitokin ailesinin bir üyesidir ve IL-12p40 ve IL-23p19 alt gruplarından oluşan heterodimerik bir sitokindir [159]. Aktive makrofajlar ve periferik dokularda lokalize olan DH'ler tarafından salgılanmaktadır [160]. Antijen sunan hücreler, T hücreleri ve endotelial hücreler IL-23p19 ifade etmekte iken, IL-12p40 gösterimi antijen sunan hücreler ile sınırlı bulunmaktadır [161]. Biyolojik olarak aktif IL-23'ün oluşumu aynı hücrede hem p40 hem de p19 alt ünitelerinin sentezini gerektirmektedir [162].

IL-23, IL-12R β 1 ve IL-23R'ünü kullanmakta, IL-12 ve IL-23 için ortak alt grup olan IL-12/23 p40 IL-12R β 1'e, IL-23p19 alt ünitesi ise IL-23R'e bağlanmaktadır [163]. IL-12R β 1 T ve NK hücrelerinin yüzeyinde, IL-23R zinciri ise çoğunlukla aktive hafıza T hücreleri, NK hücreleri ve monosit/makrofaj ve DH'ler (düşük miktarda) tarafından ifade edilmektedir [164].

IL-23'ün sinyal yolunu JAK-2, Tyk2, STAT-3, STAT-4 sinyal proteinleri ile IL-12R β 1 ve IL-23R oluşturmaktadır [165]. Reseptör kompleksinin uyarımı sonucunda Jak-2 ve Tyk2 aktive olarak STAT proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmakta, fosforile olan STAT proteinleri nükleusa transloke olarak hedef genleri aktive etmektedir. STAT-4 proteininin fosforilasyonu IFN- γ üretiminde artışa sebep olarak Th1 farklılaşmasıyla sonuçlanmakta, STAT-3 fosforilasyonu ise Th17 farklılaşmasına neden olmaktadır [166].

IL-23, doğal ve edinsel immün cevap arasında bir sitokin köprüsüdür [162]. Erken lokal immün cevapları yönlendirmede temel rol oynamaktadır [160]. IFN- γ üretiminin uyarımında, IL-17 üretiminde, NK hücre aktivasyonunda, T hücre çoğalmasında, antikor üretiminin düzenlenmesinde etkilidir [162]. IL-12'nin yönlendirdiği Th1 cevabının gelişiminin devamında ve hafıza T hücrelerine dönüşümünde görev almaktadır [50]. IL-23'ün, otoimmün ve enflamatuvar hastalıkların patogenezinde ve kronik enflamasyonun meydana gelmesinde rolü olduğu gösterilmiştir [167].

2.6. NK Hücre Reseptörleri

2.6.1. İnhibe Edici Reseptörler

Çeşitli inhibe edici reseptörler hedef hücre lizisini düzenlemekte ve NK hücrelerinin öz toleransında rol oynamaktadır. İnhibe edici reseptörler genellikle HLA-Sınıf I antijenlerini gösteren ya da stres sinyalleri iletmeyen hücreleri tanımakta olup, temel ligandları MHC-Sınıf I ve MHC-Sınıf I benzeri moleküllerdir [168].

İnhibe edici reseptörler sitoplazmik domainlerinde ortak bir yapı ve inhibe edici fonksiyon için gerekli olan immün reseptör tirozin bazlı inhibitor motifi (ITIM) paylaşmaktadır. İnhibe edici reseptörlerin ligandlarına bağlanması, ITIM motifinin fosforilasyonunu ve Ca^{+2} girişini engelleyen fosfatazların üretimini sağlayarak NK hücre fonksiyonlarını inhibe etmektedir [169].

NK hücreleri gibi T hücrelerinin bazı alt grupları HLA-A, HLA-B ve HLA-C allotiplerini tanıyan öldürücü immünglobulin benzeri reseptörler (KIR) ve HLA-E'yi tanıyan bir heterodimer olan CD94/NKG2A ifade etmektedir [170].

2.6.2. Aktive Edici Reseptörler

Aktive edici reseptörlerin, inhibe edici reseptörlere göre daha heterojen bir grup oldukları, farklı reseptör ailelerini kapsadıkları ve çeşitli sinyal yollarını kullandıkları bilinmektedir. Aktive edici reseptörler CD16, NKp30, NKp44, NKp46, 2B4, NTB-A, CS1, NKp80, CD226 ve NKG2D gibi farklı reseptörlerden oluşmaktadır [171]. NKp30, NKp44 ve NKp46 NCR ailesine ait, yapısal olarak immünoglobulin (Ig) süperaillesine ait olan, genetik olarak kodlanmış transmembran reseptörleridir [172]. NTB-A ve CS1 SLAM ilişkili reseptör ailesinin, NKp80 ve NKG2D C-tipi lektin benzeri ailesinin, CD226 ise Ig süperaillesinin bir grubudur [173]. NK hücreleri gelişimlerinin erken döneminden itibaren aktive edici NK grubu reseptörleri ifade etmeye başlamaktadır [174].

Aktive edici NK grubu reseptörlerin henüz tam olarak bilinmeyen ligandlarına bağlanması, NK hücrelerinin aktivasyonu ve hedef hücrelerin direkt lizisiyle sonuçlanmaktadır [175]. Aktive edici NK grubu reseptörler; strese uğrayan hücrelerin direkt öldürülmesine ve sitokin salınımına aracılık eden bir NK hücre reseptör grubudur [176]. NK hücrelerinin tümünde ifade edilmekle birlikte bazı T hücre alt gruplarında da ifade edildiği bildirilmiştir [177]. İmmün cevapların dengesini düzenlemede önemli rol

oynamaktadırlar [178]. İnsanlarda şimdiye kadar NKp30, NKp44 ve NKp46 olmak üzere üç çeşit NCR belirlenmiştir [179].

2.6.2.1. NKp30

NKp30; yapısal olarak bir V-tipi tek ekstrasellüler Ig benzeri domain ile, 120 amino asitten oluşan ekstrasellüler bir bölgeyi takip eden 190 amino asitlik bir sinyal peptidinden; transmembran bölgesi ise, pozitif yüklü arjinin rezidüsü içeren 33 amino asitlik ITAM içermeyen sitoplazmik bölgeden oluşmaktadır [180]. NKp30, CD3zeta (ζ) zinciri ile birlikte bulunmakta ve aktive edici sinyali iletebilmektedir [181].

NKp30 reseptörünü kodlayan gen (NCR3), insan MHC lokusunun Sınıf III bölgesinin telomerinde lokalize (kromozom 6p21) olmaktadır [182]. NCR3 geni, mRNA splice varyantlarına transkribe edilmekte ve NKp30'un sürekli olarak ifade edilen, farklı sinyaller ileten, üç izoformunun oluşumuna neden olmaktadır [183]. NKp30a ve NKp30b izoformlarının olgunlaşmamış DH'ler üzerindeki ligandlarına bağlanması, yüksek miktarlarda IFN- γ ve TNF- α üretimi ile sonuçlanmaktadır. NKp30 izoformları içinde sadece NKp30a tek başına sitotoksisiteyi tetikleyebilmekte; NKp30c izoformu, proenflamatuvar sitokin sentezini ve sitotoksisiteyi indüklememekte, NKp30c'nin ligandına bağlanması anti-enflamatuvar bir sitokin olan IL-10 üretimine neden olmaktadır [182].

Dinlenme hâlindeki ve aktive olan NK hücreleri sürekli olarak NKp30 ifade etmektedir [173]. NKp30, DH'ler ile NK hücrelerinin etkileşiminde temel rol oynamaktadır. Enfekte olan DH'lerin NK hücreleri tarafından tanınması NKp30 aracılığıyla gerçekleşmektedir. NKp30 cevapsız, anormal ya da olgunlaşmamış DH'leri lize ederek DH'lerin olgunlaşmasını düzenleyebilmektedir [15]. NKp30 aracılı etkileşimin sonucunda NK hücre yayılması, sitokin üretimi ve antijen spesifik T hücre cevabı geliştirilmekte ve böylece edinsel immün cevap başlatılmaktadır [184].

HLA-B ile ilişkili - transkript 3 (BAT3), sitomegalovirüs, pp65 protein ve enflamatuvar koşullarda da ifade edilen B7-H6, NKp30 için farklı hücresel ligandlar olarak belirlenmiştir [185].

2.6.2.2. NKp44

NCR2 geni MHC-Sınıf III bölgesi içinde 6. kromozomda lokalize olmuştur [186]. NKp44 moleküler olarak V şeklinde tek bir ekstrasellüler domainden oluşmaktadır.

NKp44'ün transmembran domaini bir lizin residüsü ile birlikte sinyal iletiminde görev alan ITAM içeren adaptör bir proteinden (DAP12 - 12 kD sinyal - ileten adaptör) oluşmaktadır [187]. Sadece aktive olan NK hücrelerinde ifade edilen NKp44 [186], NK hücreleri dışında, desidual hücreler, doğal lenfoid hücreler 3 ve tonsillerde IFN- γ üreten hücrelerin bir alt grubu tarafından ifade edilmektedir [188].

2.6.2.3. NKp46

NKp46, en dış membranında iki adet Ig-benzeri domain, transmembran domain sinyal iletimine aracılık eden ITAM taşıyan polipeptit adaptörler içermektedir [186]. NKp46'nın yapısal olarak sitoplazmik kuyruğu çok kısadır ve herhangi bir sinyal motifi içermemektedir [189]. Hedef hücreye NKp46 bağlanması sonucu NKp46'nın transmembran domaininde ITAM taşıyan CD3 ζ ve FcR γ aracılığıyla uyarımı (sinyal) tetiklenmektedir [190].

NKp46 hem dinlenme hâlindeki, hem de aktive olan NK hücrelerinde ifade edilmektedir [173]. NKp46'nın, *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olan monositlerin yüzeyinde gösterilen bir filament proteini olan vimentine bağlanması sonucu monositlerin NK hücreleri tarafından lize edildiği gösterilmiştir [191].

NKp46 heparan sülfat motiflerine bağlanabilmekte ve NK hücre fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir [192]. Noe-fare modeli (NKp46 molekülünde rastgele mutasyonlar oluşturularak ifadesinin kaybına neden olan model) kullanılarak, NKp46'nın NK hücre aktivitesinin down-regülasyonunda ve T hücre cevaplarının gelişiminde düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir [193].

NKp46 ligandı ifade eden nötrofillerin NK hücreleriyle etkileşimi sonucunda, kaspaz aracılı nötrofil apoptozisi ve Fas/FasL yoluyla NK hücreleri tarafından nötrofillerin lize edildiği gösterilmiştir. NKp46⁺ NK hücreleri aracılığıyla oluşan apoptozis, istenmeyen immün cevaplardan kaçınmak için efektör hücreleri yok ederek enflamasyonun sonlanmasına aracılık etmektedir [17].

Periodontit fare modellerinde, çeşitli bakterilerin NKp46'ya direkt olarak bağlandığı ve yüksek miktarlarda TNF- α üretimiyle abartılı bir immün yanıt oluşturduğu gösterilmiştir [194].

2.6.3. CD94/NKG2 Ailesi

NK hücre grup 2 (NK cell group 2-NKG2) ailesi C-tipi lektin benzeri reseptörler grubundandır. NKG2 grubu, CD94/NKG2C ve HLA-E için spesifik E reseptörlerinden oluşmaktadır. Bir membran glikoproteini olan CD94 ile NKG2 heterodimer olarak ifade edilmektedir. CD94/NKG2C ve CD94/NKG2E, DAP12 sinyal molekülleri aracılığıyla sinyal iletmektedir [195]. NKG2 ailesine ait olan diğer bir reseptör ise NKG2D'dir.

2.6.4. NKG2D

NKG2D geni 12. kromozom üzerinde NK gen kompleksi bölgesinde lokalize olmuştur [196]. NKG2D evrimsel süreçte oldukça korunmuştur ve düşük sayıda nükleotid değişimleri içermektedir [197]. NKG2D yapısal olarak bir C-tipi lektin benzeri transmembran reseptörüdür ve homodimer olarak ifade edilmektedir [198]. NKG2D, DAP10 adaptör molekülü aracılığıyla sinyal ileterek güçlü sitotoksik cevaplar oluşturmaktadır [199].

NKG2D proteini, tüm NK hücrelerinde, aynı zamanda $\gamma\delta$ T, CD8⁺ T ve aktive CD4⁺ T hücreleri tarafından ifade edilmektedir [200]. Hiperproliferatif hücreler, transforme hücreler, patojenlerle enfekte hücrelerin eliminasyonunda ve stresle uyarılan moleküllerin tanınması için genel bir sensör olarak görev yapmaktadır [201].

NKG2D'nin hücreler üzerindeki ifadesi sitokinlerle değiştirilebilmektedir. IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 ve IFN- α ile NKG2D ifadesi arttırılmakta; TGF- β , IL-21, IL-4, IFN- γ ile ise azaltılmaktadır [202].

NKG2D ligandlarının sağlıklı hücrelerin yüzeyinde genellikle bulunmamasına karşılık, viral enfeksiyonlar veya malign değişimler ile oluşan hücresel stres sonucunda ifade edilmektedir [203]. NKG2D MHC-Sınıf I benzeri proteinlere bağlanmaktadır. MICA/MICB ve UL-16 bağlayan protein (UL-16 binding proteins - ULBPs) NKG2D ligandları olarak belirlenmiştir [201]. ULBP proteinlerinin NKG2D aracılığıyla NK hücrelerine çapraz bağlanması NK hücre sitotoksik kapasitesini arttırmakta ve IFN- γ , TNF- α , lenfotoksin, GM-CSF, CCL1 ve CCL4'ün üretimini uyarmaktadır [204].

MICA proteini enfekte ve malign transforme hücrelerin yüzeyindeki gösterime ek olarak hücre aktivasyonu sürecinde de ifade olmaktadır [205, 206]. MICA molekülünün NKG2D'ye bağlanması sonucu strese yol açan hücre lize olmakta ve NKG2D ifade eden hücreden IFN- γ salınmaktadır [207].

2.7. T Lenfositleri

T lenfositleri timusta olgunlaşmakta ve burada T hücre reseptörü ifade etmeye başlamaktadır. Yüzeylerinde ya CD8 glikoproteini (CD8⁺ T lenfositleri - sitotoksik T hücreleri) ya da CD4 glikoproteini (CD4⁺ T lenfositleri - yardımcı T hücreleri) ifade etmektedir. CD4⁺ T hücreleri farklı sitokin sekresyonlarına göre alt gruplara farklılaşmaktadır: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T regülatör (Treg) ve T folüküler hücreler (T_{FH}) [208]. Tüm CD4⁺ Th1 alt grupları naif CD4⁺ T hücrelerinden spesifik sitokinler ile farklılaşmaktadır. Naif CD4⁺ T hücrelerinden IFN- γ ve IL-12 etkisiyle Th1'e; IL-4 etkisi ile Th2'ye; IL-1, IL-6 ve IL-23 etkisiyle ise Th17 hücrelerine farklılaşma gerçekleşmektedir [209].

T hücrelerinin yüzeylerinde T hücre reseptörü (THR) peptid yüklü MHC moleküllerini tanıyarak T hücrelerini aktive etmektedir [210]. Aktive olan T hücreleri, T hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını sağlayan IL-2 üretmekte ve aktive olan T hücresi, mikroçevresinde içerdiği sitokinlere göre ayrı efektör özellikler gösteren alt gruplara farklılaşmaktadır [211].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmaya aktif ve inaktif dönemindeki Behçet hastaları ile sağlıklı kontroller dâhil edilmiştir. Çalışmanın tüm deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Behçet Hasta Grubu

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı polikliniğinde takip edilen, ”*Uluslararası Behçet Hastalığı Çalışma Grubu*”’nın kriterlerine göre BH tanısı almış, 18-60 yaş aralığındaki, başka bir kronik hastalığı olmayan Behçet hastaları dâhil edilmiştir.

Uluslararası Behçet Hastalığı Çalışma Grubu’nun tanımladığı tanı kriterleri aşağıda belirtilmiştir:

- 1- Oral ülser (1 yıl içinde en az 3 kez tekrarlayan),
- 2- Genital ülser,
- 3- Göz lezyonları,
- 4- Deri lezyonları,
- 5- Deri Paterji Testi’nin pozitifliğidir.

Tekrarlayan oral ülserlere ek olarak en az iki bulgunun bulunması ile BH tanısı koyulabilmektedir [212]. Hastaların klinik özellikleri Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu

Kronik bir hastalığı ve enfeksiyonu olmayan, hastalarla yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı erişkin gönüllüler çalışmaya alınmıştır.

3.2. Örneklerin Toplanması

Hasta ve sağlıklı kontrol grupları araştırmamız hakkında bilgilendirildikten sonra, çalışmaya katılmayı kabul eden ve Aydınlatılmış Onam Formu imzalayan bireylerden, heparinize tüpe 15 mL periferik kan örneği alınmıştır. Çalışmaya aktif (n= 7; yaş ortalaması= 32; 4 kadın-3 erkek) ve inaktif dönemde olan (n= 7; yaş ortalaması= 39; 5

kadın-2 erkek) Behçet hastaları ile sağlıklı kontroller (n= 6; yaş ortalaması= 37; 3 kadın-3 erkek) alınmıştır.

Tablo 3-1: Hastaların yaş, cinsiyet ve klinik özellikleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Hastalık Aktivitesi	Tutulum	Tedavi
Hasta 1	41	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 2	36	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 3	30	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 4	30	Kadın	Aktif	Mukokutenöz, göz	Hücre siklus inhibitörü, DNA sentez inhibitörü
Hasta 5	21	Erkek	İnaktif	Mukokutenöz, vasküler, göz	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 6	26	Erkek	Aktif	Mukokutenöz, vasküler, göz	Hücre siklus inhibitörü, DNA sentez inhibitörü
Hasta 7	28	Kadın	Aktif	Mukokutenöz, vasküler, pulmoner arter	DNA sentez inhibitörü, Hücre siklus inhibitörü, steroid
Hasta 8	38	Erkek	Aktif	Mukokutenöz	Hücre siklus inhibitörü, Steroid
Hasta 9	50	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz, vasküler, göz	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 10	65	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz, vasküler	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 11	30	Kadın	İnaktif	Mukokutenöz, vasküler	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 12	38	Kadın	Aktif	Mukokutenöz, üveit	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 13	42	Kadın	Aktif	Mukokutenöz, vasküler	Hücre siklus inhibitörü
Hasta 14	28	Erkek	Aktif	Mukokutenöz	Hücre siklus inhibitörü

Hücre siklus inhibitörü: Kolşisin, DNA sentez inhibitörü: Azatioprin

3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Çalışmada kullanılan monoklonal antikorlar Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan monoklonal antikorlar

BELİRTEÇ	FLUOKROM	KLON	FİRMA
CD3	FITC	HIT3a	eBioscience, San Diego, CA
CD3	APC	HIT3a	BD, San Jose, CA
CD4	PER-CP	S3.5	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CD8	APC-CY7	HIT8a	Biolegend, SanDiego, CA
CD16	PE-CY7	CB16	eBioscience, San Diego, CA
CD16	FITC	3G8	BD, San Jose, CA
CD69	Pasifik Blue	FN50	Biolegend, SanDiego, CA
CD56	PE-Cy7	B159	eBioscience, San Diego, CA
CD107a	PE	eBioH4A3	eBioscience, San Diego, CA
NKG2D	PE	1D11	eBioscience, San Diego, CA
NKp30	PE	AF29-4D12	eBioscience, San Diego, CA
NKp46	PE	9E2	Biolegend, San Diego, CA
IL-12RB2	APC	305719	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.3’de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan solüsyonlar

KULLANILAN SOLÜSYONLAR	FİRMA
10X Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS)	Lonza, Belçika
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Life Tec., İngiltere
Ficoll Solüsyonu	Biochrom AG, Berlin, Almanya
100X Penisilin ve streptomisin karışımı	Lonza, Belçika
RPMI 1640	Lonza, Belçika
Fetal Sığır Serum (FCS)	Lonza, Belçika
FACS buffer (1X PBS ve % 10 FCS)	BD Bioscience, USA
Lysing buffer (10X BD Pharm Lyse)	BD Bioscience, USA
PMA (Forbol 12-Myristat 13-asetat)	Biolegend, San Diego, CA
Ionomisin	Biolegend, San Diego, CA

Çalışmada kullanılan gereçler Tablo 3.4’de listelenmiştir.

Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan gereçler

KULLANILAN GEREÇLER	FİRMA
Falkon Tüpler (15 ve 50ml), corning santrifüj tüpleri	Sigma-aldrich, Almanya
6 kuyulu kültür plak (corning costar)	Sigma-aldrich, Almanya
96 kuyulu kültür plak (corning costar)	Sigma-aldrich, Almanya
Pastör pipetleri (brand pipet)	Sigma-aldrich, Almanya
5mL polistren tüpler (corning brand)	BD Bioscience, ABD

Çalışmada kullanılan cihaz ve yazılım Tablo 3.5’de listelenmiştir

Tablo 3-4: Çalışmada kullanılan cihaz ve yazılımlar

KULLANILAN CİHAZ VE YAZILIM	FİRMA
Akan Hücre Ölçer	BD FACSAria II
Akan Hücre Ölçer	BD FACSCalibur
Santrifüj	NÜVE NF 1200R
İnkübatör	Thermo SCIENTIFIC
Hücre Sayım Cihazı	Rayto Auto Hematology Analyzer
Laminar Flow	NÜVE LN 120
Diva Yazılım	BD

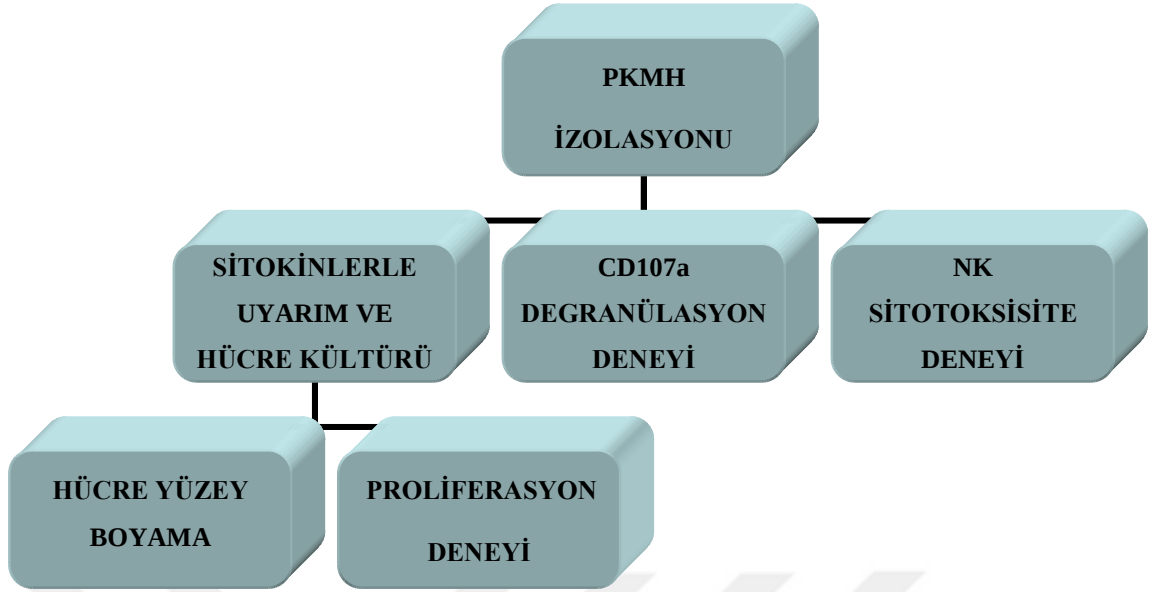
Çalışmada kullanılan rekombinant sitokinler Tablo 3.6’da listelenmiştir.

Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan rekombinant sitokinler

KULLANILAN REKOMBİNANT SİTOKİNLER	FİRMA
hr IL-12	Gibco life tech, USA
hr IL-15	Gibco life tech, USA
hr IL-18	MBL life tech, USA
hr IL-23	Gibco life tech, USA

3.4. Çalışma Şeması

Behçet hastaları ve kontrol gruplarından heparinli tüpe alınan kanlardan PKMH’ler izole edilmiştir. İzole edilen hücrelerden eş zamanlı olarak NK sitotoksosite deneyi, CD107a deneyi ve farklı sitokin kombinasyonlarının varlığında gerçekleştirilen hücre kültürünün ardından hücre yüzey moleküllerinin ifade ölçümü ve proliferasyon deneyleri yapılmıştır.



Şekil 3-1: Çalışma planının şematik gösterimi

3.5. PKMH İzolasyonu

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından alınan heparinize periferik venöz kan örnekleri (15 mL), 1:1 oranında PBS ile dilüe edilmiştir. Falcon tüp içine kan miktarı kadar oda sıcaklığındaki steril Ficoll solüsyonu eklendikten sonra, üzerine Ficoll solüsyonunun iki katı kadar, 1:1 oranında dilüe edilmiş olan kan örneği Pastör pipeti yardımıyla eklenmiştir. Bu işlem sırasında Ficoll ve kan örneğinin birbirine karışmamasına dikkat edilmiştir. Falcon tüp 2000 devirde 25 dakika santrifüj edilerek kan örneğinin yoğunluk farkına göre katmanlara ayrılması sağlanmıştır. En üstte bulunan plazma tabakası uzaklaştırıldıktan sonra, Ficoll ile plazma arasında bulunan, PKMH'lerin oluşturduğu bulutsu "interfaz" tabakası pastör pipeti ile toplanarak 15 ml'lik steril Falcon tüpüne alınmıştır. Toplanan PKMH'lerin üzerine yıkama amaçlı steril PBS çözeltisi eklendikten sonra 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılıp, çöktürülmüş olan PKMH'ler üzerine tekrar steril PBS eklenerek 10 dakika 1800 devirde ikinci kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama sonrası üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH'lerin üzerine 2 ml zenginleştirilmiş (% 1 streptomisin + penisilin, % 10 FCS, % 1 L-glutamin ile) RPMI-1640 medyumuna eklenmiş ve otomatik kan sayım cihazı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü ve Sitokinlerle Uyarım

PKMH'ler her kuyucukta 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde 24 kuyucuklu steril kültür plaklarına eklenmiştir. Hücreler IL-12, IL-15, IL-18 ve IL-23 sitokin kombinasyonları ile ve sitokin ilavesi yapılmadan kültüre edilmiştir. Sitokinlerin eklenmesini takiben pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Kültür plakları 37°C 'de % 5 CO_2 içeren etüvde 48 saat süreyle kültüre alınmıştır. Tablo 3.7'de her bir kuyucukta kullanılan sitokin kombinasyonları ve konsantrasyonları gösterilmektedir.

Tablo 3-6: Hücre kültüründe kullanılan sitokin kombinasyonları ve dozları [213-216]

KUYU	UYARIM	REKOMBİNANT SİTOKİN DOZLARI
1	UYARIMSIZ	UYARIMSIZ
2	IL-12+IL-18	IL-12 (1ng/mL) + IL-18 (100 ng/mL)
3	IL-12+IL-23	IL-12 (1ng/mL) + IL-23 (10 ng/mL)
4	IL-18+IL-23	IL-18 (100 ng/mL) + IL-23 (10 ng/mL)
5	IL-12+IL-15	IL-12 (1ng/mL) + IL-15 (10 ng/mL)
6	IL-23+IL-15	IL-23 (10 ng/mL) + IL15 (10 ng/mL)
7	IL-18+IL-15	IL-18 (100 ng/mL) + IL-15 (10 ng/mL)

3.7. Hücre Yüzey Boyama

Farklı sitokin kombinasyonları ile 48 saat inkübe edilen PKMH'ler toplanarak üzerlerine PBS eklenmiş ve 1800 devirde 10 dakika santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücre yüzey molekül ifadelerini tespit etmek amacıyla boyama işlemine geçilmiştir. Bu amaçla anti-CD3-FITC, -CD4-Per-CP, -CD8-APC-Cy7, -CD69-Pasific blue, -CD16-PE-Cy7, -IL12R β 2-APC işaretli monoklonal antikorlar içeren 3 tüp hazırlanmış ve her birine PE işaretli anti-NKp30, -NKp46 ve -NKG2D monoklonal antikorları ayrı ayrı eklenmiştir. Daha sonra bu tüplere 2.5×10^5 hücre/mL içerecek miktarda PKMH süspansiyonu eklenerek, 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben üzerlerine PBS eklenen tüpler, 1800 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 300 μL PBS eklenerek akan hücre ölçer cihazında

değerlendirilmiştir. Total lenfositler, T hücreleri ve NK hücreleri CD69, IL-12R β 2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 ifadeleri açısından incelenmiştir.

3.8. NK Sitotoksikite Ölçümü

NK hücre sitotoksik aktivitesinin saptanması amacıyla hedef hücre olarak K562 eritromiyeloid lösemi hücre serisi kullanılmıştır. RPMI-1640 medyumunda yaşatılan K562 hücre süspansiyonunun üzerine canlı hücreleri saptamak amacıyla 4 μ l CFSE (10 μ M) eklenerek, karanlık ortamda 10 dk +4⁰C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası K562 hücrelerinin üzerine steril soğuk PBS eklenerek, 5 dakika 2000 devirde santrifüj edilmiştir. Üst sıvıları uzaklaştırılan hücrelerin üzerine 2 ml RPMI-1640 eklendikten sonra hücre sayımı yapılmıştır.

PKMH'ler ve CFSE ile işaretlenmiş olan K562'ler, efektör:hedef oranı 10:1 (5x10⁵ PKMH ve 5x10⁴ K-562) olacak şekilde 48 kuyucuklu kültür plaklarına eklenerek, üzerlerine 500 μ L'ye tamamlanacak miktarda RPMI-1640 eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücrelerin karışması sağlanmıştır. Kontrol olarak yalnız K562 ve yalnız PKMH'lerin bulunduğu kuyucuklar hazırlanmıştır. Hücreler 37⁰C % 5 CO₂ içeren etüvde 4 saat kültüre alınmıştır.

Kültür sonrası hücreler toplanarak tüplere alınmış ve üzerlerine ölü hücreleri işaretlemek amacıyla 5 μ l Propidium Iodid (10 μ g/mL) eklenerek -20⁰C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Yalnız K562, yalnız PKMH ve PKMH+K562 içeren tüpler akan hücre ölçer cihazı ile değerlendirilmiştir. PKMH+K562 tüpünde K562 popülasyonu kapılanarak, propidium iodid ile boyanmış olan ölü K562 hücre oranının saptanmasıyla sitotoksik aktivite tayini yapılmıştır.

3.9. Proliferasyon Deneyi

PKMH'ler izole edildikten sonra, 2 mL medyum içinde 1x10⁶ hücre bulunacak şekilde hücre sayımı yapılmıştır. Hücrelerin üzerine floresan bir boya olan CFSE (1 μ M/mL) eklenip pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra karanlıkta 6 dakika +4⁰C'de inkübe edilmiştir. CFSE ile işaretlenen hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve üzerine 1 mL RPMI-1640 eklenerek otomatik hücre sayım cihazıyla hücre sayımı yapılmıştır. PKMH'ler, 96 kuyucuklu düz tabanlı kültür plağı içine, her kuyucuğa 1x10⁵ hücre olacak şekilde 200 μ L hacimde eklenmiştir. Hücrelerin üzerine hr IL-23, hr IL-12, hr IL-15 ve hr IL-18'in farklı kombinasyonları (Tablo 3.7) eklenip 37⁰C % 5 CO₂ içeren

etüvde 5 gün inkübe edilmiştir. Kültür sonrası hücreler 2 ml'lik tüplere alınarak anti-CD3-APC ve -CD56-PE-Cy7 monoklonal antikoları ile boyanmıştır. Akan hücre ölçerle yapılan değerlendirmede, CD3⁺ T ve CD3⁺CD56⁺ NK hücrelerinin proliferatif kapasiteleri analiz edilmiştir.

3.10. CD107a Degranülasyon Deneyi

PKMH'lerin sayımı yapılarak 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde zenginleştirilmiş RPMI-1640 içerisinde homojen dağılımı sağlanmıştır. Hücreler (2×10^5) stimülyasyonsuz ve K562 hücreleri ile efektör:hedef oranı 10:1 olacak şekilde uyarılmıştır. Her kuyuya PE işaretli CD107a antikoru eklenerek oluşturulan hücre karışımları 37°C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 1. saatinde kuyulara monensin (6 µg/mL) eklenmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler anti-CD3-FITC ve CD16-PE-Cy5 ile boyanıp, akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir.

3.11. İstatistik

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılımları Shapiro - Wilk testi kullanılarak değerlendirilmiş, elde edilen veriler $p < 0.05$ olduğu için istatistiklerde non-parametrik testler kullanılmıştır. İki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmış, sonuçların $p = 0.05$ 'ten küçük olması anlamlılık seviyesi olarak kabul edilmiştir. Veriler bar grafikleri ile ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur.

4. BULGULAR

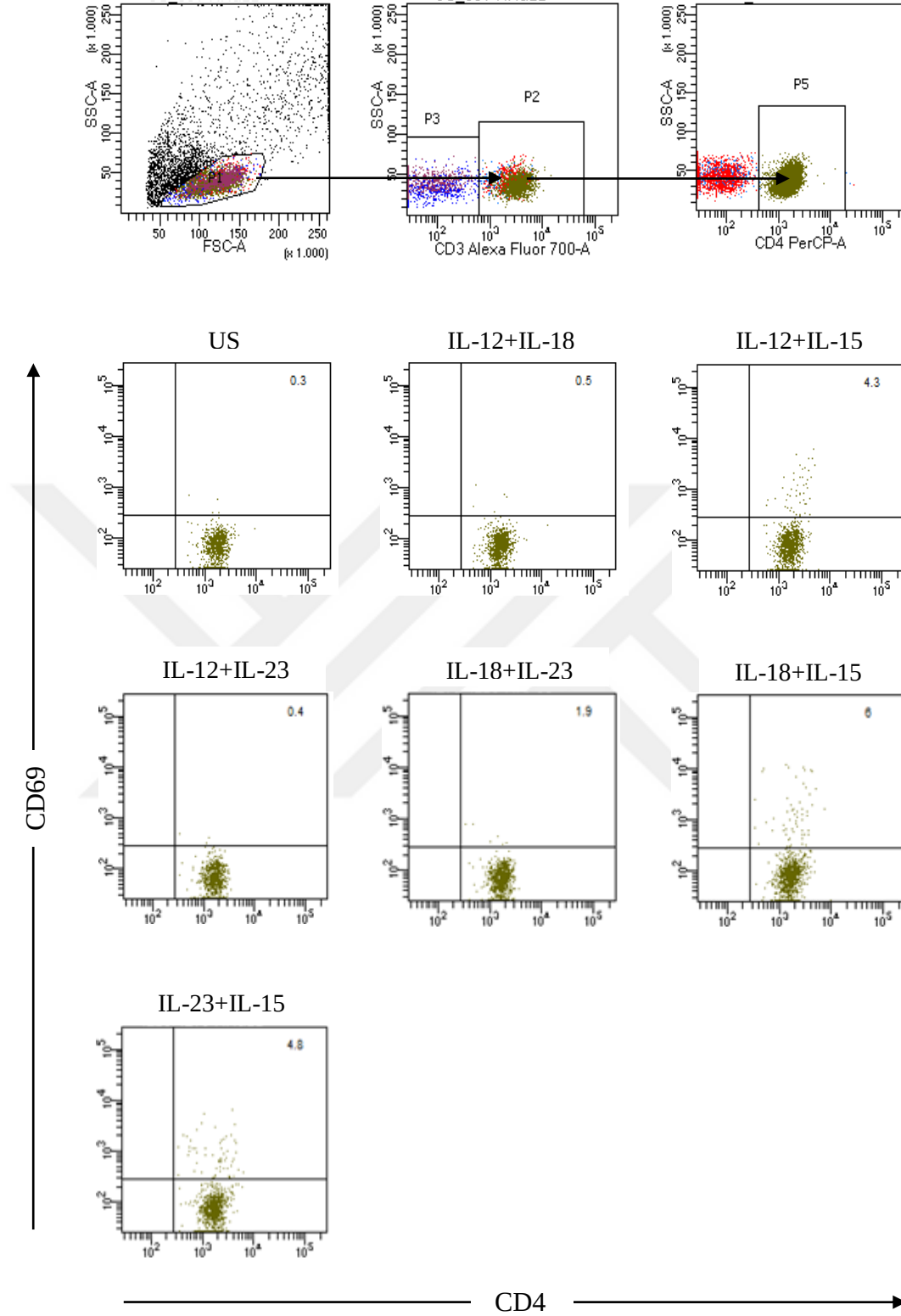
4.1. CD4⁺, CD8⁺ T ve CD3⁺CD16⁺ NK Hücrelerinde CD69, IL-12R β 2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları

Aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları ile sağlıklı kontrollerin periferik kan örneklerinden elde edilen PKMH'ler, US koşulda ve IL-12+IL-15, IL-18+IL-15, IL-23+IL-15, IL-12+IL-23, IL-18+IL-23 ve IL-12+IL-18 sitokin kombinasyonları ile uyarılarak kültüre edilmiştir. Kültür sonrası CD69, IL-12R β 2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 hücre yüzey ifade oranları; CD4⁺, CD8⁺ T ve CD3⁺CD16⁺ NK hücre popülasyonları içerisinde akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Lenfosit popülasyonu forward-scatter (FSC) ve side-scatter (SSC) özelliklerine göre hücrelerin büyüklük ve granülariteleri değerlendirilerek belirlenmiştir.

4.1.1. CD4⁺ T Lenfositlerdeki CD69, IL-12R β 2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları

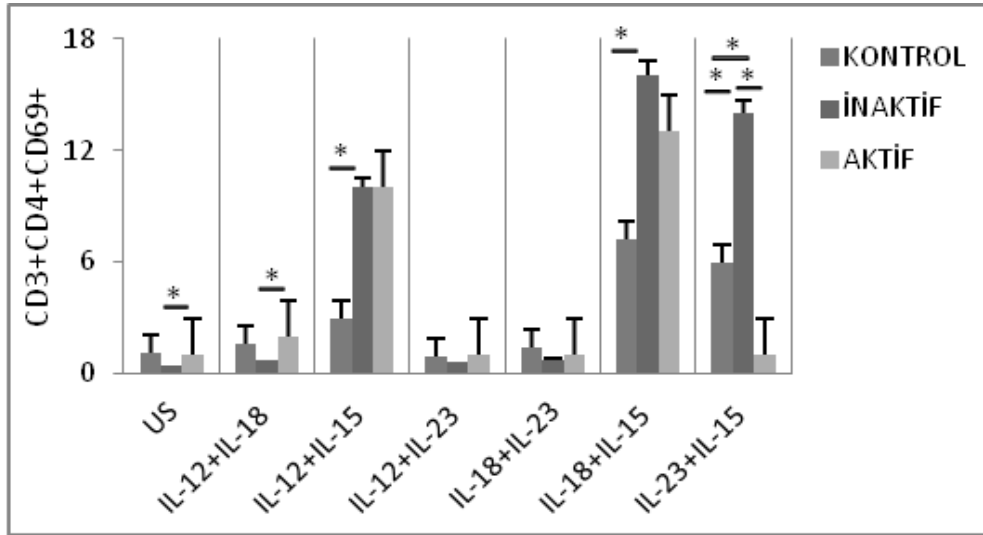
4.1.1.1. CD4⁺ Hücre Popülasyonunda CD69 Oranları

Aktif belirteci olarak kullanılan CD69 proteininin, aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları ile sağlıklı bireylerdeki ifadeleri incelenmiştir. Bu amaçla, Behçet hasta grupları ile sağlıklı kontrol grubu PKMH'lerinin farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımı yapılarak kültüre edilmesinden sonra, CD3⁺ T lenfositlerin içerisinde CD4⁺ T lenfosit kapısı alınarak CD3⁺CD4⁺ T lenfositlerinde CD69 oranı incelenmiştir. Sağlıklı bir bireye ait US ve farklı sitokinlerle uyarım sonucu saptanan CD4⁺CD69⁺ hücrelerin akan hücre ölçer analiz çıktısı Şekil 4.1'de örnek olarak sunulmuştur.



Şekil 4.1: US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu CD3⁺ T lenfosit kapısında CD4⁺CD69⁺ hücreler

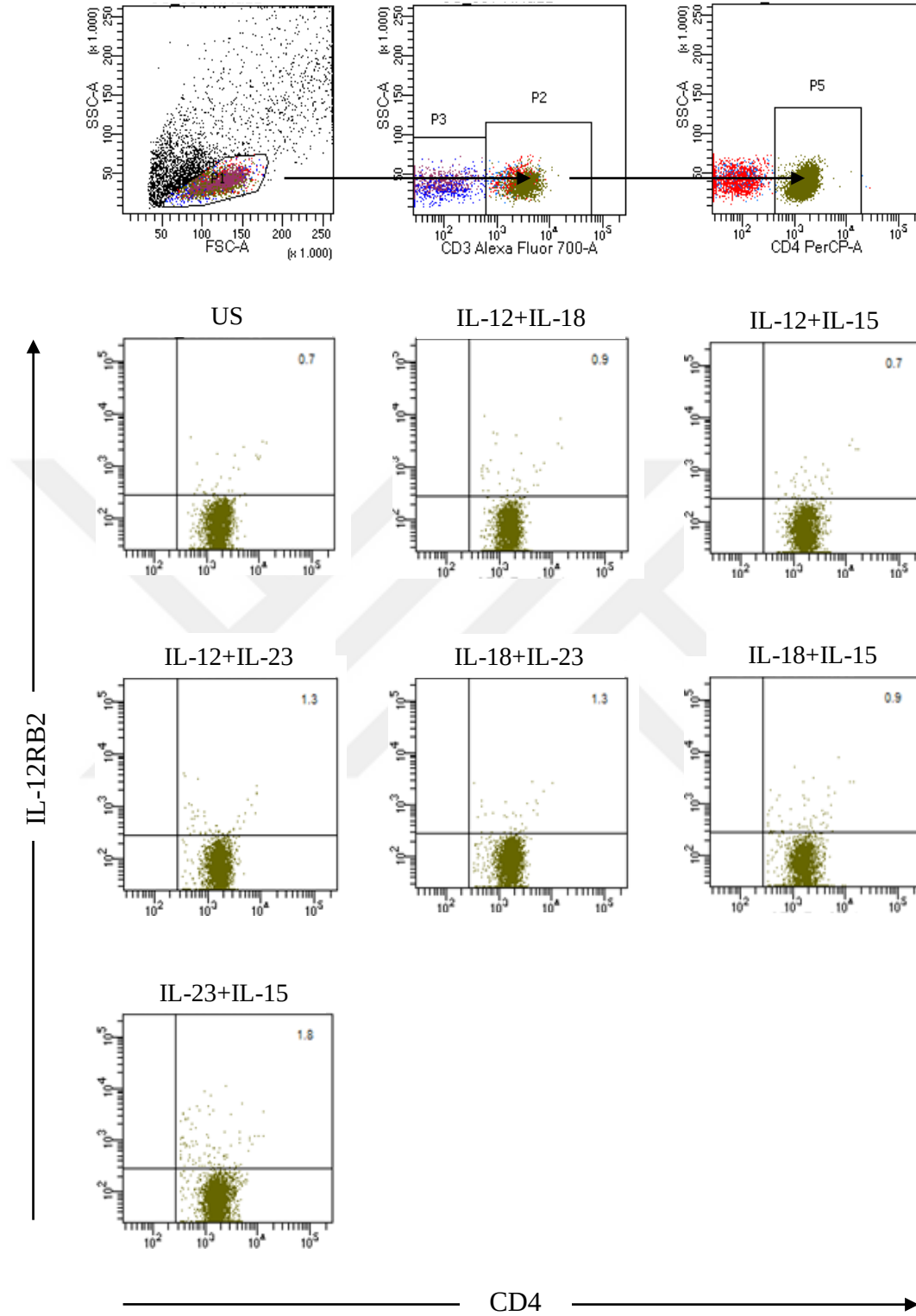
CD4⁺ T lenfosit popülasyonu içindeki CD69 ifade oranları incelendiğinde; US durumunda ve IL-12+IL-18 ile uyarımda aktif grupta inaktif gruba göre daha yüksek oranda CD69 ifadesi belirlenmesine karşın, IL-23+IL-15 ile uyarımda inaktif grubunda aktif grubuna göre artış olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.008, p=0.03 ve p=0.009). IL-12+IL-15, IL-23+IL-15 ve IL-18+IL-15 ile uyarımlar sonucu inaktif grup Behçet hastalarının CD69 oranlarının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.01, p=0.016 ve p=0.009). Aktif dönemindeki Behçet hastaları ile sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldığında ise, IL-23+IL-15 ile uyarım sonucu inaktif grupta CD69 ifade oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (p=0.009).



Şekil 4.2: Aktif, inaktif ve kontrol gruplarında CD3⁺CD4⁺CD69⁺ hücre oranları

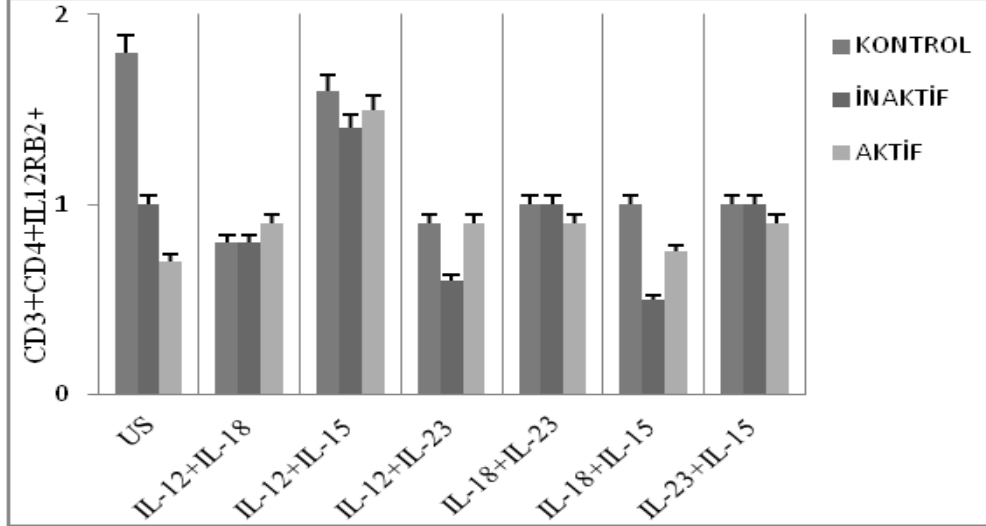
4.1.1.2. CD4⁺ T Hücre Popülasyonunda IL-12Rβ2 Oranı

Çalışmamızda, Behçet hastalarında hastalığa yatkınlık geni olarak belirlenen IL-12Rβ2'nin CD3⁺CD4⁺ T lenfosit popülasyonunda IL-12Rβ2 ifade oranı araştırılmıştır. Behçet hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında CD4⁺ T hücrelerinde IL-12Rβ2 ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu amaçla, hasta ve sağlıklı gruplardan elde edilen PKMH'ler US koşulda ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarılarak kültüre edildikten sonra, CD3⁺ T lenfosit popülasyonu içerisinde CD4⁺ T lenfosit kapısı alınmıştır. Sağlıklı bir bireye ait CD3⁺CD4⁺IL-12Rβ2⁺ hücre grupları Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucunda lenfosit popülasyonu içindeki CD3⁺CD4⁺IL-12Rβ2⁺ hücreler

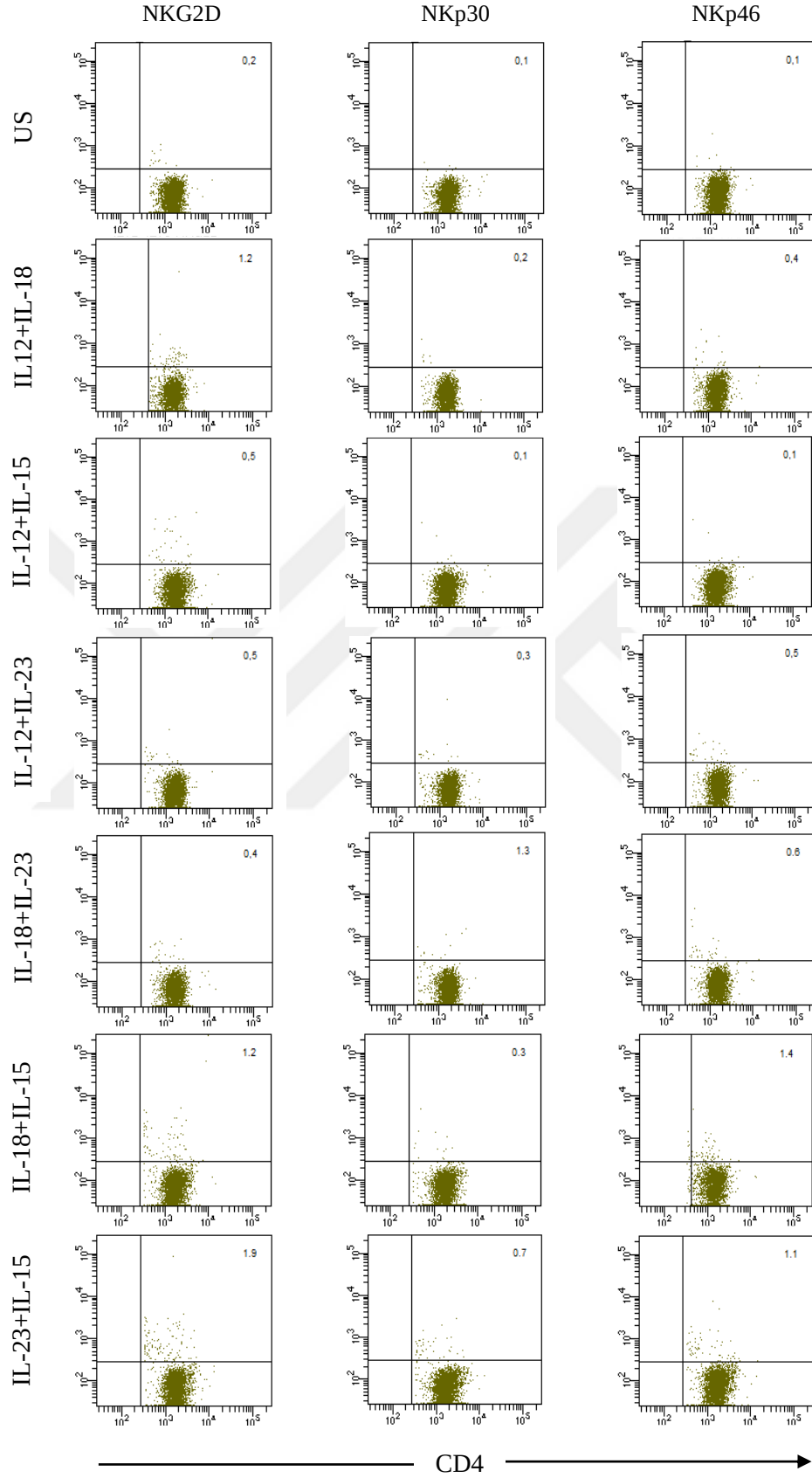
US şartlarda ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımları takiben, aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında, IL-12R β 2 oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımlar sonucu hasta ve kontrol grubu lenfosit popülasyonlarında CD3⁺CD4⁺IL-12R β 2⁺ hücre oranları

4.1.1.3. CD4⁺ T Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Hücre Oranları

US koşulda ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımı takiben, aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarındaki CD4⁺ T lenfosit oranları ile CD4⁺NKG2D⁺, CD4⁺NKp30⁺ ve CD4⁺NKp46⁺ hücre oranları değerlendirilmiştir. Bu amaçla, kültür sonrası PKMH total lenfositleri içinden CD3 kapısı alındıktan sonra CD4⁺ T hücre grubu tespit edilmiş ve CD4 ile birlikte NKG2D, NKp30 ve NKp46 pozitifliği gösteren hücreler analiz edilmiştir. Sağlıklı bir bireyin farklı kültür koşulları sonrasında yapılan analiz sonuçları Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: CD3⁺CD4⁺ T Lenfosit kapısında US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları

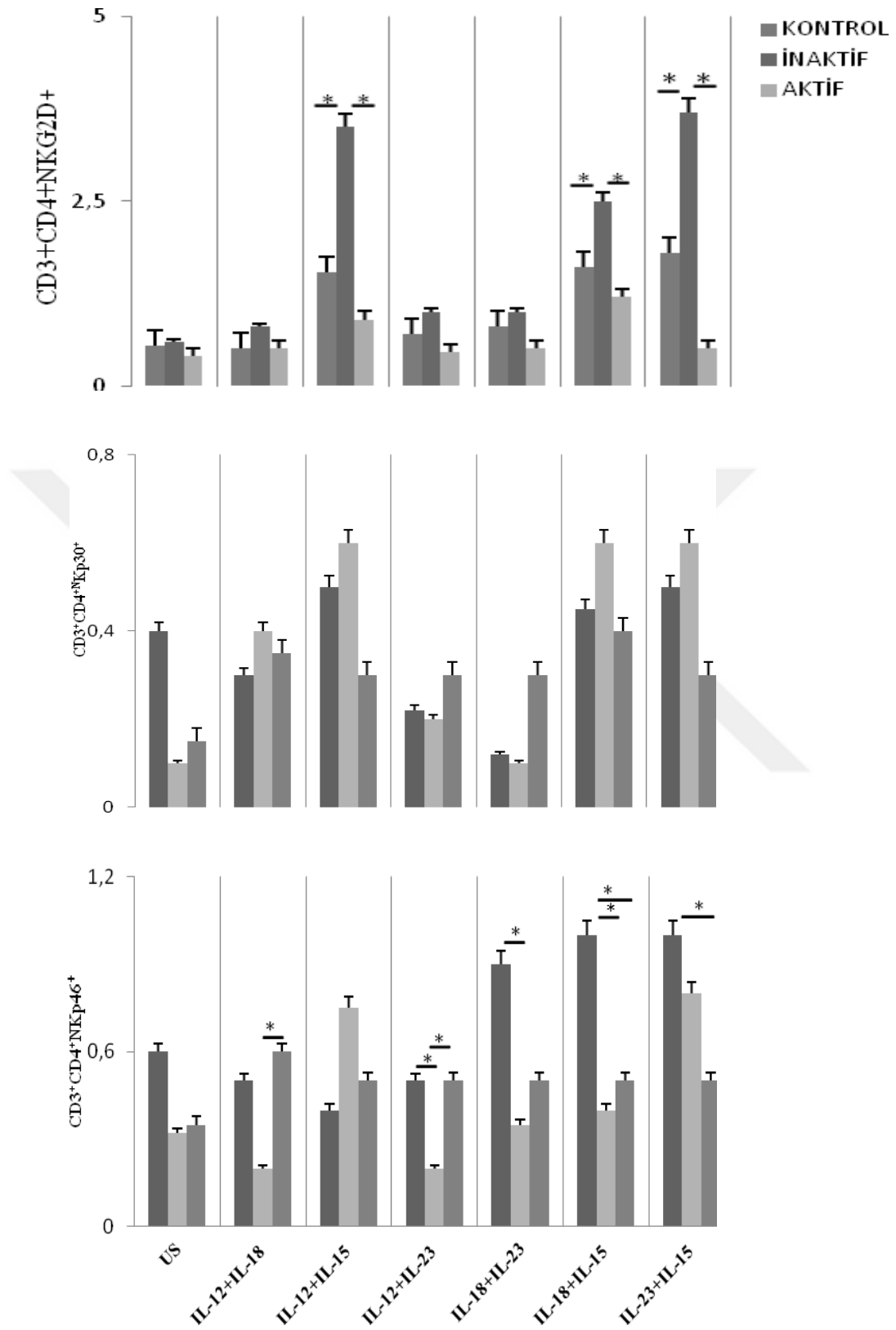
Sağlıklı bireylerde $CD4^+$ T hücre grubunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 ifadeleri US koşulda oldukça düşük oranlarda saptanmıştır (sırasıyla, % 0.5, % 0.4 ve % 0.6).

IL-12+IL-15, IL-23+IL-15 ve IL-18+IL-15 sitokin kombinasyonları ile uyarımlarda hem aktif-inaktif hem de kontrol-inaktif grupları arasında $CD4^+NKG2D^+$ lenfosit yüzdesinde inaktif grupta artış belirlenmiştir (sırasıyla, $p=0.009$, $p=0.008$, $p=0.009$, $p=0.03$, $p=0.009$ ve $p=0.01$). US koşulla karşılaştırıldığında, IL-15'in dahil olduğu sitokin kombinasyonları ile uyarımın, hastalar ve sağlıklı kontrol gruplarındaki $CD4^+NKG2D^+$ hücre oranlarında artışa neden olduğu görülmüştür. Özellikle, US koşulda inaktif (% 0.6) ve sağlıklı kontrol (% 0.4) gruplarında düşük düzeylerde olan $CD4^+NKG2D^+$ oranının, IL-23+IL-15 uyarımı sonucu artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (sırasıyla, % 3.7 ve % 1.8) (Şekil 4.6).

İnaktif Behçet hastalarındaki $CD4^+NKp30^+$ lenfositlerin, IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 ile uyarımı sonucunda, aktif ve sağlıklı kontrol gruplarına oranla düşük olduğu gözlenmesine karşılık anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.6).

IL-12+IL-18 ve IL-12+IL-23 sitokinleriyle uyarım sonrası inaktif Behçet hastalarındaki $CD4^+NKp46^+$ lenfosit oranlarının aktif gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla, $p=0.008$, $p=0.01$) (Şekil 4.7). IL-15+IL-23 ve IL-18+IL-15 ile uyarımı takiben aktif gruptaki $CD4^+NKp46^+$ lenfosit oranlarının ise kontrol grubu Behçet hastalarına göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0.047$, $p=0.01$) (Şekil 4.6).

IL-12+IL-23, IL-18+IL-23 ve IL-18+IL-15 sitokin kombinasyonları ile uyarım sonrasında, inaktif dönem hasta grubundaki $CD4^+NKp46^+$ lenfosit düzeylerinde sağlıklı kontrol grubuna göre azalma olduğu saptanmıştır (sırasıyla, $p=0.015$, $p=0.027$ ve $p=0.03$) (Şekil 4.6).

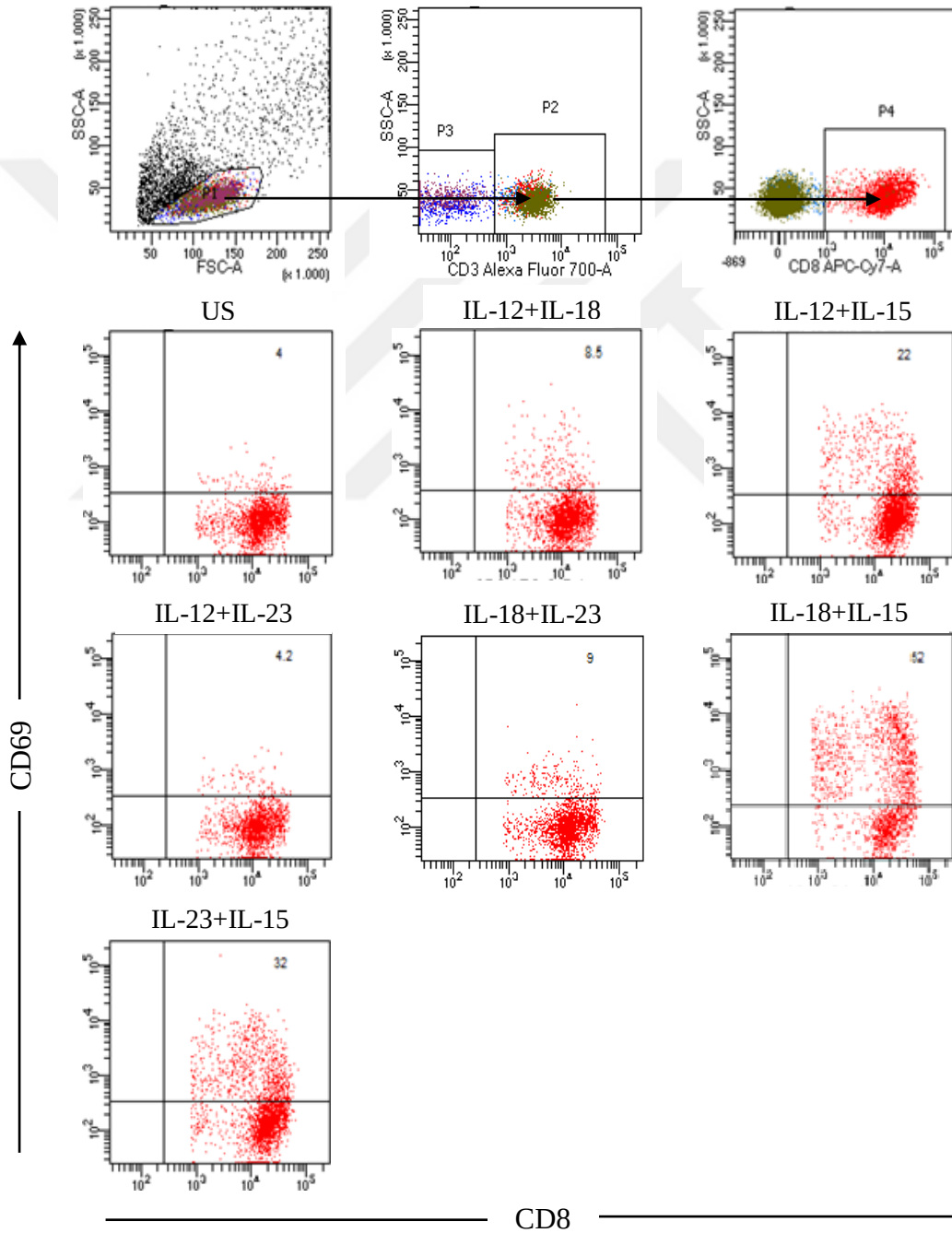


Şekil 4.6: PKMH'lerin US koşulda ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımları sonucu CD3⁺CD4⁺ T lenfosit popülasyonundaki NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları

4.1.2. Behçet Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol Grubunda CD69, IL-12RB2, CD8⁺NKG2D⁺, CD8⁺NKp30⁺ ve CD8⁺NKp46⁺ Hücre Oranları

4.1.2.1. CD8⁺ Hücre Populasyonunda CD69 Oranları

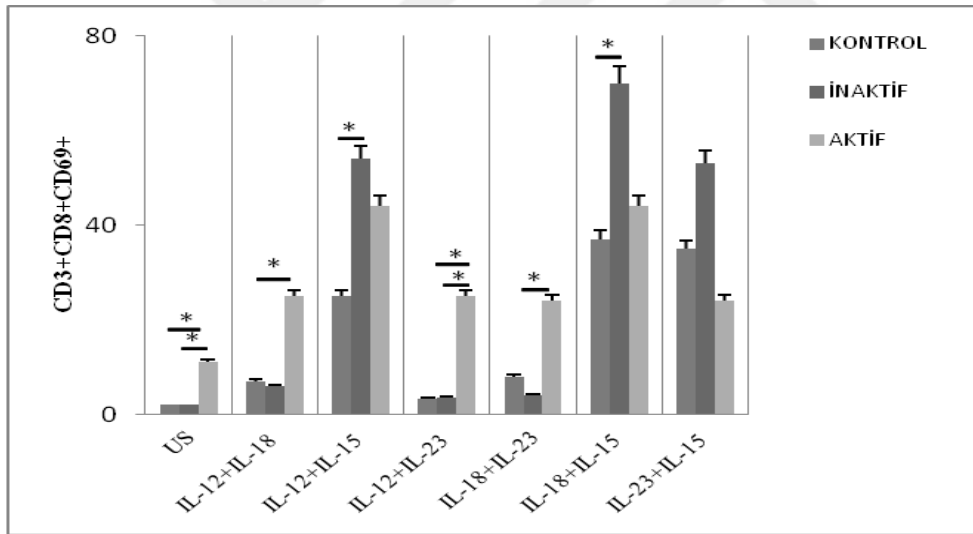
Sağlıklı bir bireyde FSC/SSC histogramında total lenfosit kapısı işaretlendikten sonra, CD3⁺ T hücreleri CD3/SSC histogramında kapılanmış, takiben CD8⁺ T hücreleri işaretlenmiştir. US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu CD8 ve CD69 ifadesini gösteren akan hücre ölçer analizi Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: CD8⁺ hücre kapısındaki CD8⁺CD69⁺ lenfositlerin akan hücre ölçer ile gösterimi

US koşulda sağlıklı bireylerdeki $CD3^+CD8^+$ T lenfositlerin $CD69^+$ oranı % 2 olmasına karşılık, IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonları ile uyarımları takiben yaklaşık 15 kat arttığı gözlenmiştir.

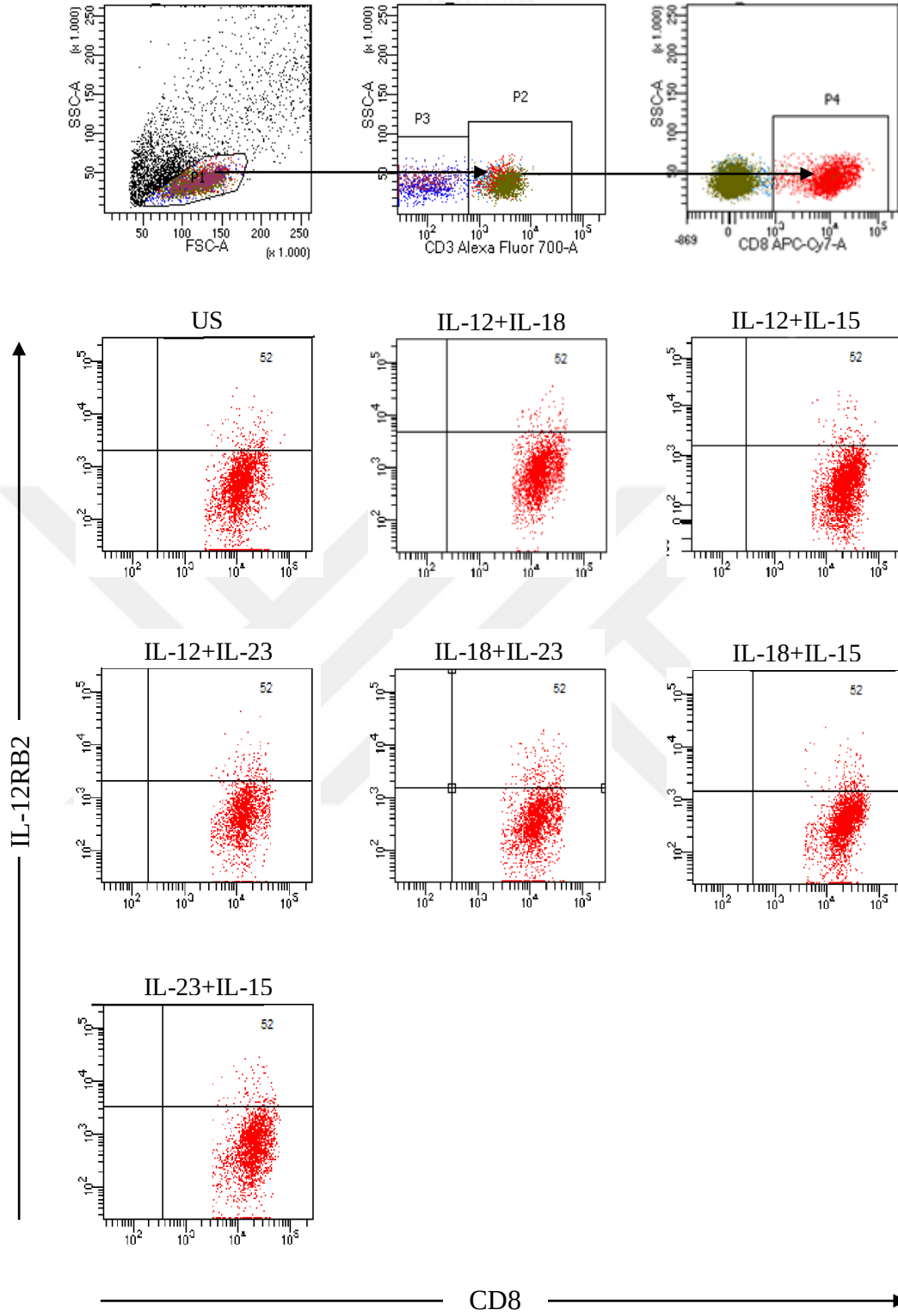
US koşulda, aktif dönemdeki Behçet hastalarının $CD69^+$ lenfosit oranları, hem inaktif dönemdeki Behçet hastalarına hem de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla, $p=0.012$, $p=0.01$). Aktif Behçet hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, IL-12+IL-18 ve IL-12+IL-23 sitokin kombinasyonları ile uyarım sonrası aktif grup $CD69^+$ lenfosit yüzdesindeki artışın sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p=0.02$ ve $p=0.009$). Lenfositlerin IL-12+IL-15 ve IL-18+IL-15 ile uyarımı sonucu inaktif gruptaki $CD69^+$ lenfosit yüzdesinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilirken, IL-12+IL-23 ve IL-18+IL-23 ile uyarım sonrası aktif grubun inaktif gruba göre artış olduğu saptanmıştır (sırasıyla, $p=0.009$, $p=0.03$, $p=0.009$ ve $p=0.03$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: $CD3^+CD8^+CD69^+$ hücre oranlarının gruplar arasında karşılaştırılması

4.1.2.2. $CD8^+$ T Hücre Popülasyonunda IL-12RB2 Oranları

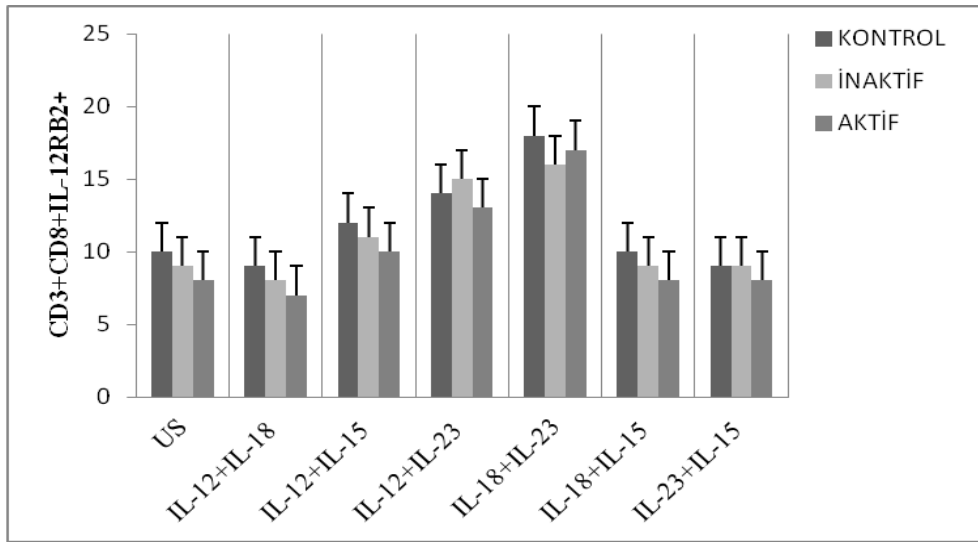
Sağlıklı bir bireyde total lenfosit kapısı alındıktan sonra, $CD3^+$ T hücreleri $CD3/SSC$ histogramında kapılanmasının ardından $CD8^+$ T hücreleri işaretlenmiştir. US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu $CD8$ ve IL-12R β 2 ifadesini gösteren örneğin akan hücre ölçerden alınan analiz görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9: CD3⁺ ve CD8⁺ T hücre kapısı içinde farklı sitokin kombinasyonlarına yanıtta IL-12Rβ2 oranları

US koşulda $CD3^+CD8^+$ T lenfositlerinde % 10 oranında ifade edilen IL-12R β 2, IL-12+IL-23 ve IL-18+IL-23 sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucunda artış göstermiştir.

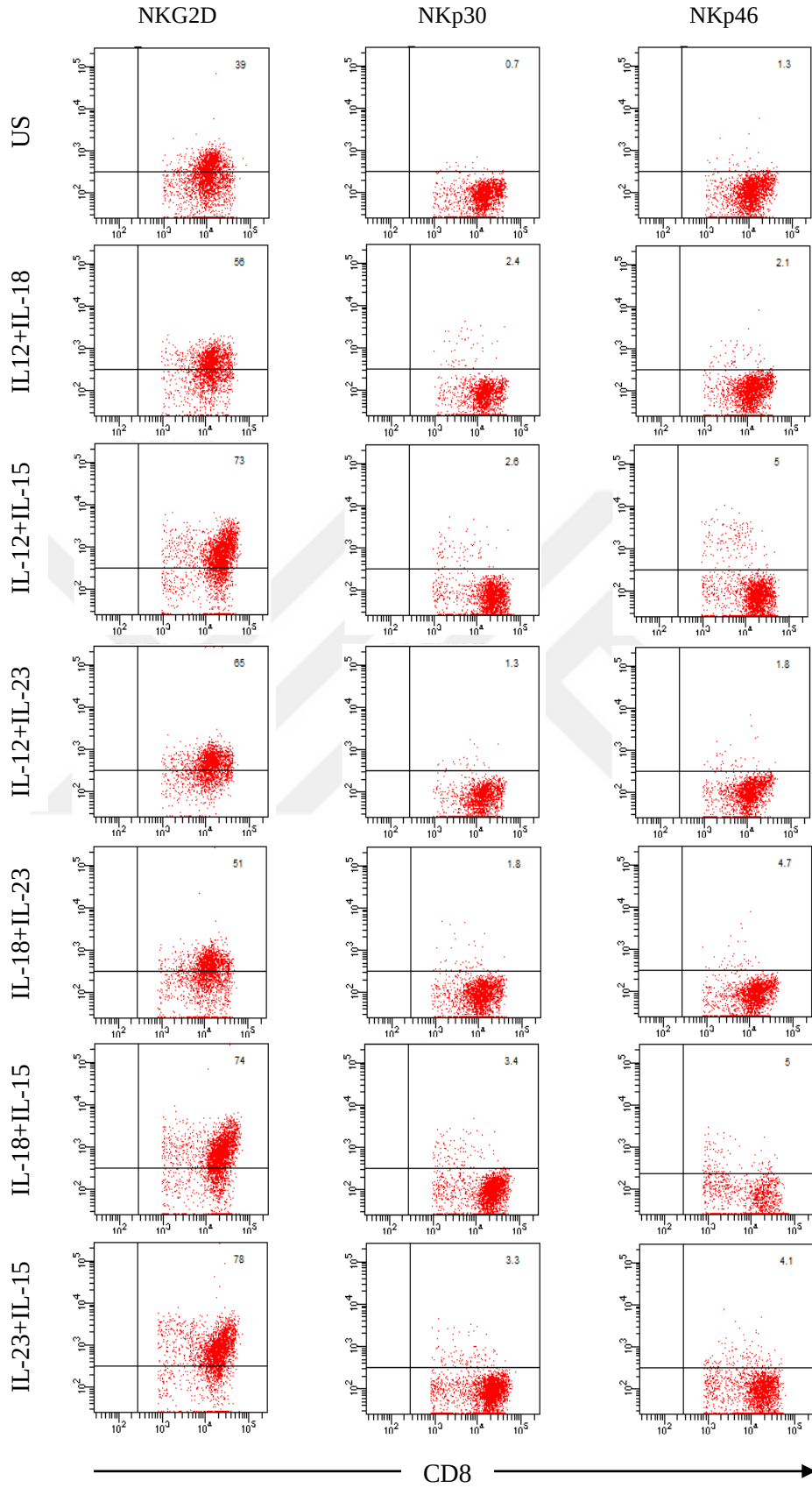
Gruplar arasında $CD3^+CD8^+$ T hücreleri, IL-12R β 2 ifade oranları yönünden değerlendirildiğinde; US koşulda ve sitokin kombinasyonları ile uyarımlar sonucunda aktif, inaktif ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı fark belirlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonrası $CD3^+CD8^+IL-12R\beta 2^+$ hücre oranları

4.1.2.3. $CD8^+$ T Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları

Aktif ve inaktif dönemindeki Behçet hastaları ile sağlıklı bireylerdeki $CD8^+$, $CD8^+NKG2D^+$, $CD8^+NKp30^+$ ve $CD8^+NKp46^+$ hücre oranlarını tespit etmek amacıyla, farklı koşullarda kültüre edilen PKMH'ler içerisinde total lenfosit kapısındaki $CD3^+$ T hücreleri kapılanarak $CD8^+$ T hücreleri seçilmiş ve NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları değerlendirilmiştir. Sağlıklı bir bireyden alınan örneğin akan hücre ölçer cihazında yapılan analiz sonuçları Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

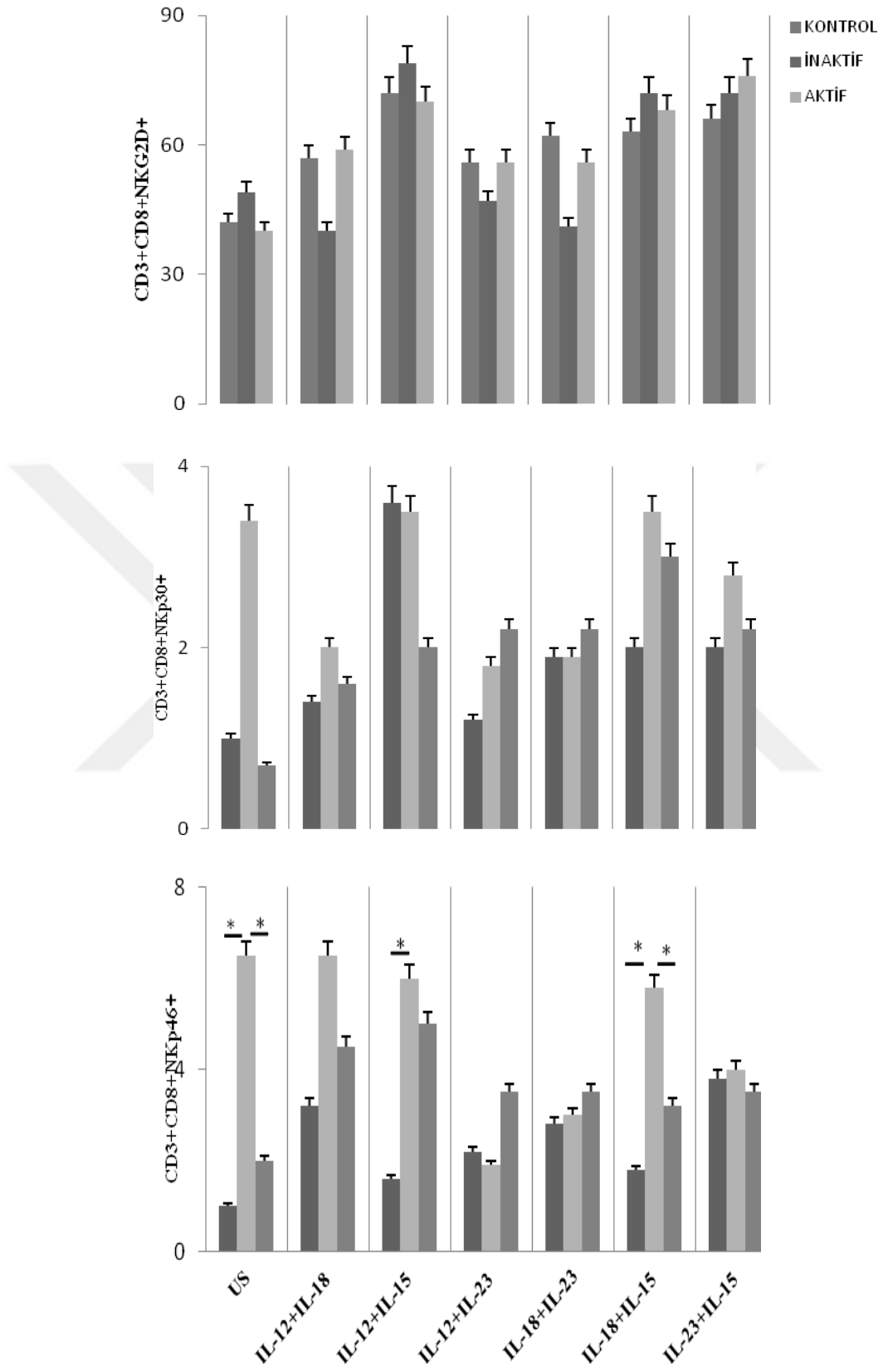


Şekil 4.11: $CD8^+NKG2D^+$, $CD8^+NKp30^+$ ve $CD8^+NKp46^+$ hücre oranlarının $CD3^+CD8^+$ T hücre kapsısı içinde değerlendirilmesi

US ve farklı sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu, Behçet hasta grupları ve kontrol grupları arasında $CD3^+CD8^+NKG2D^+$ lenfosit yüzdesi yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). US durumunda, IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucu, hastalar ve sağlıklı kontrol grubu $CD8^+NKG2D^+$ hücre oranlarında artış görülmüştür. Özellikle, US koşulda aktif (% 40), inaktif (% 49) ve sağlıklı kontrol (% 42) gruplarında düşük düzeylerde olan $CD8^+NKG2D^+$ hücre oranının, IL-12+IL-15 uyarımı ile dikkate değer şekilde artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (sırasıyla, % 72, % 79 ve % 70).

US koşulda aktif grupta ve sağlıklı kontrol grubunda $CD8^+NKp30^+$ lenfosit oranı yaklaşık % 1, inaktif grubunda ise % 3.4 olarak saptanmıştır. IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 sitokin kombinasyonları ile uyarım sonrası, sağlıklı kontroller (sırasıyla, % 3.6, % 2 ve % 2) ve aktif grubu US duruma göre (sırasıyla, % 2, % 3 ve % 2.2) artış gösterirken inaktif gruptaki (sırasıyla, % 3.4, % 3.5 ve % 2.8) $CD8^+NKp30^+$ hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

US durumunda, $CD8^+NKp46^+$ lenfosit oranı kontrol grubunda % 1, aktif grupta % 2 ve inaktif grupta % 6.5 olarak belirlenmiştir. US koşulda ve IL-18+IL-5 ile uyarımı takiben inaktif gruptaki $CD8^+NKp46^+$ lenfositlerin ifadesi, aktif gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu (sırasıyla, $p=0.03$ ve $p=0.04$), kontrol grubunun $CD8^+NKp46^+$ ifadesi inaktif gruba göre daha düşük olduğu ve US koşulda, IL-12+IL-15 ve IL-18+IL-15 uyarımları sonucu düştüğü saptanmıştır (sırasıyla, $p=0.02$, $p=0.03$ ve $p=0.04$) (Şekil 4.12).

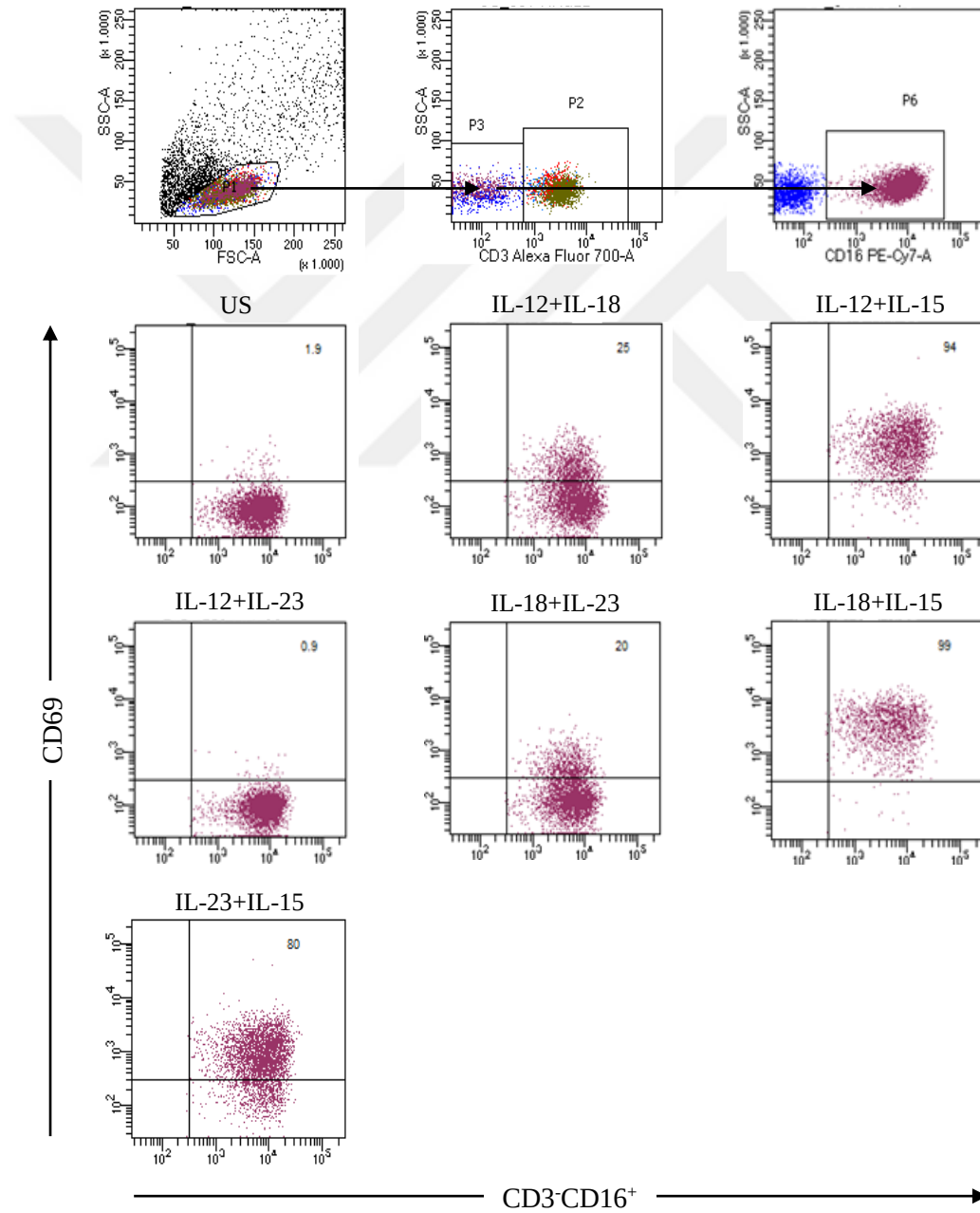


4.12: Behçet hastaları ve kontrol gruplarında CD8⁺NKG2D⁺, CD8⁺NKp30⁺ ve CD8⁺NKp46⁺ lenfosit oranları

4.1.3. Behçet Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontrol Grubunda CD3⁺CD16⁺ NK Hücrelerinin CD69, IL-12RB2, CD3⁺CD16⁺, NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları

4.1.3.1. CD3⁺CD16⁺ Hücre Popülasyonunda CD69 Oranı

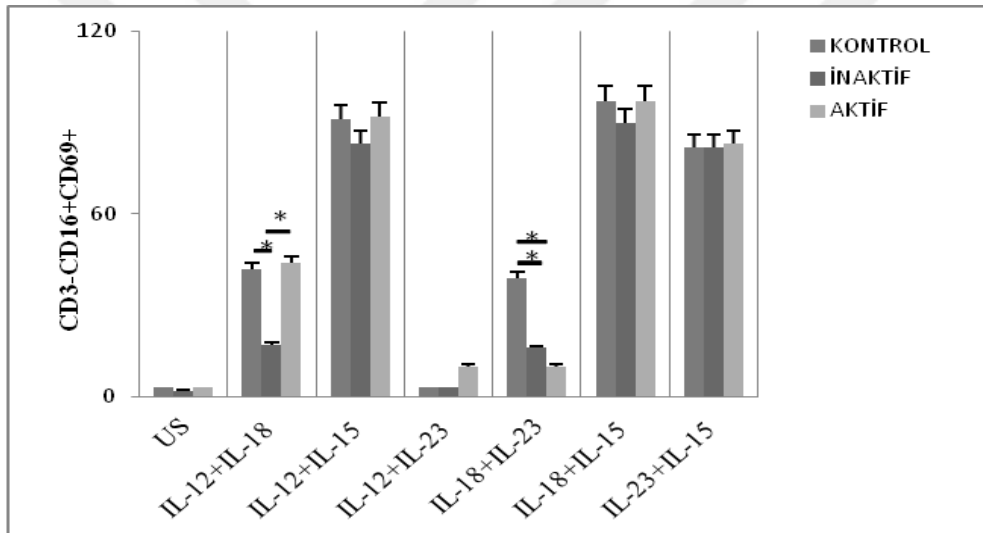
Behçet hastaları ve kontrol gruplarındaki CD3⁺CD16⁺ NK hücre popülasyonlarını incelemek amacıyla, total lenfosit kapısındaki CD3⁺ hücreler seçilmiş, CD3⁺ hücreler içinde CD16 ifade eden hücrelerin CD69, IL-12RB2, NKG2D, NKp30 ve NKp46 ifadeleri ölçülmüştür. Farklı kültür koşullarına cevaben sağlıklı bir bireyin CD3⁺CD16⁺ NK hücrelerinin CD69 ifadeleri Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13: Akan hücre ölçer cihazında PKMH’lerin kapılama stratejisi ve CD3⁺CD16⁺CD69⁺ hücrelerin analizi

Aktif ve inaktif dönemdeki hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının US koşuldaki CD3⁺CD16⁺ NK hücre gruplarında CD69⁺ lenfositlerin oranı düşük iken (% 2 ± 3), IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonları ile uyarımları takiben yaklaşık 30 kat arttığı gözlemlenmiş, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

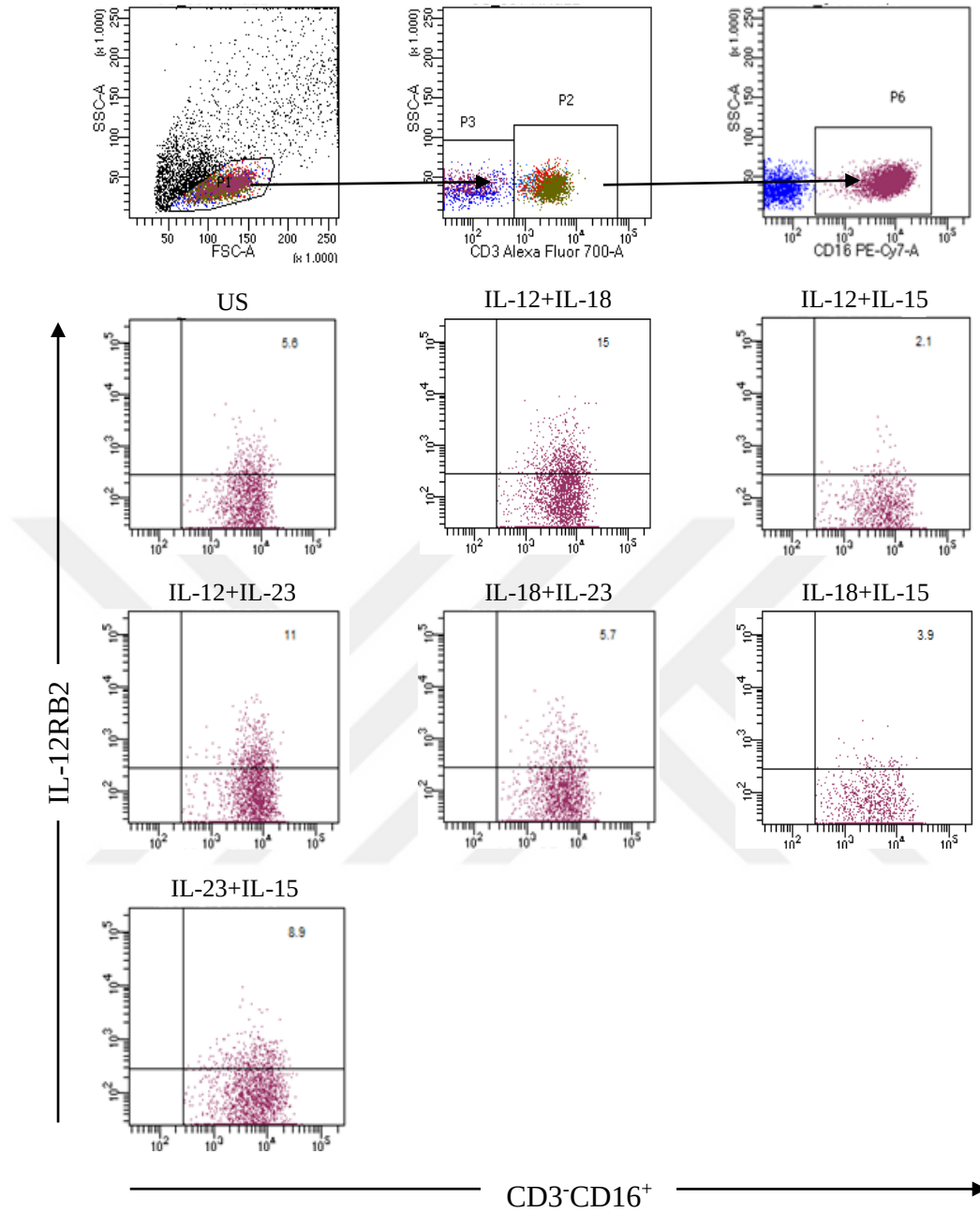
IL-12+IL-18 sitokin kombinasyonu ile uyarım sonucu hem aktif dönemdeki Behçet hasta grubunda hem de sağlıklı kontrol grubunda CD69⁺ lenfosit oranının, inaktif dönemde olan Behçet hasta grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek seviyede olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.03 ve p=0.032). IL-18+IL-23 ile uyarımda ise aktif ve inaktif gruptaki CD69⁺ lenfosit oranının sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.01 ve p=0.02) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: US koşulda ve farklı sitokinlerle uyarım sonrası CD3⁺CD16⁺CD69⁺ hücre oranları

4.1.3.2. CD3-CD16⁺ NK Hücre Popülasyonunda IL-12RB2 Oranı

CD3-CD16⁺ NK hücre popülasyonundaki IL-12RB2 ifadelerinin farklı sitokin uyarımlarına yanıt olarak değişimlerinin akan hücre ölçer cihazıyla gerçekleştirilen analizi, sağlıklı kontrol grubundan bir bireye örnekte Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

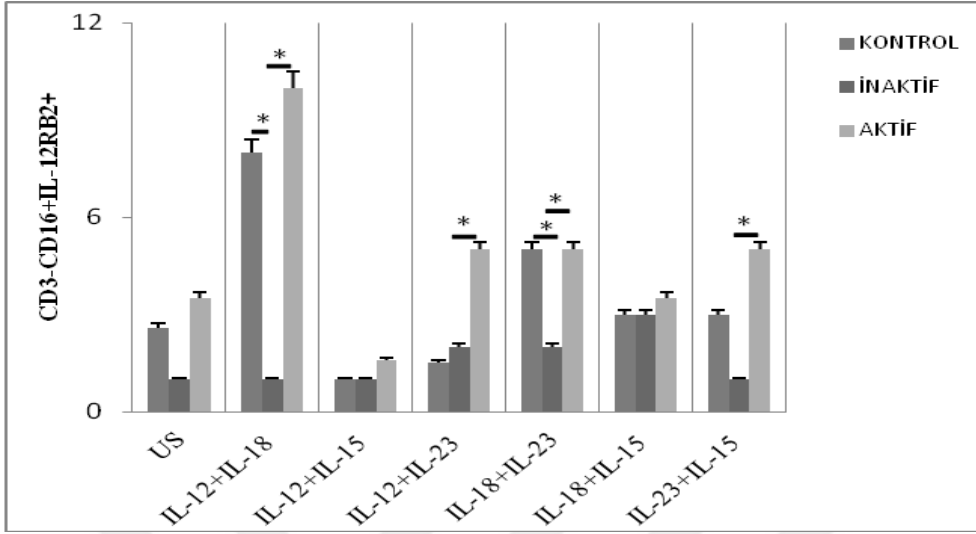


Şekil 4.15: CD3⁺CD16⁺IL-12Rβ2⁺ hücre popülasyonunun akan hücre ölçer cihazında analiz görüntüleri

IL-12+IL-18, IL-18+IL-23 ve IL-23+IL-15 kombinasyonları ile uyarımları takiben, aktif grup lenfositlerinde IL-12Rβ2 ifadesinin inaktif gruba göre yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p=0.035$, $p=0.04$ ve $p=0.005$).

IL-12+IL-23 ile uyarım sonucu IL-12Rβ2 ifadesi aktif grupta kontrol grubuna göre yüksek iken ($p=0.036$), IL-12+IL-18 ve IL-18+IL-23 sitokin kombinasyonları ile

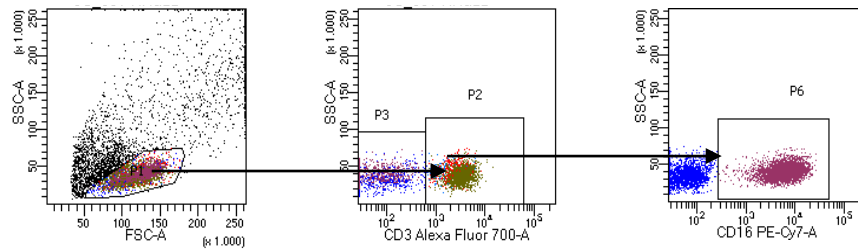
uyarım sonrası, inaktif gruptaki IL-12R β 2⁺ lenfosit oranının, sağlıklı kontrollere göre düşük olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.0015 ve p=0.046).

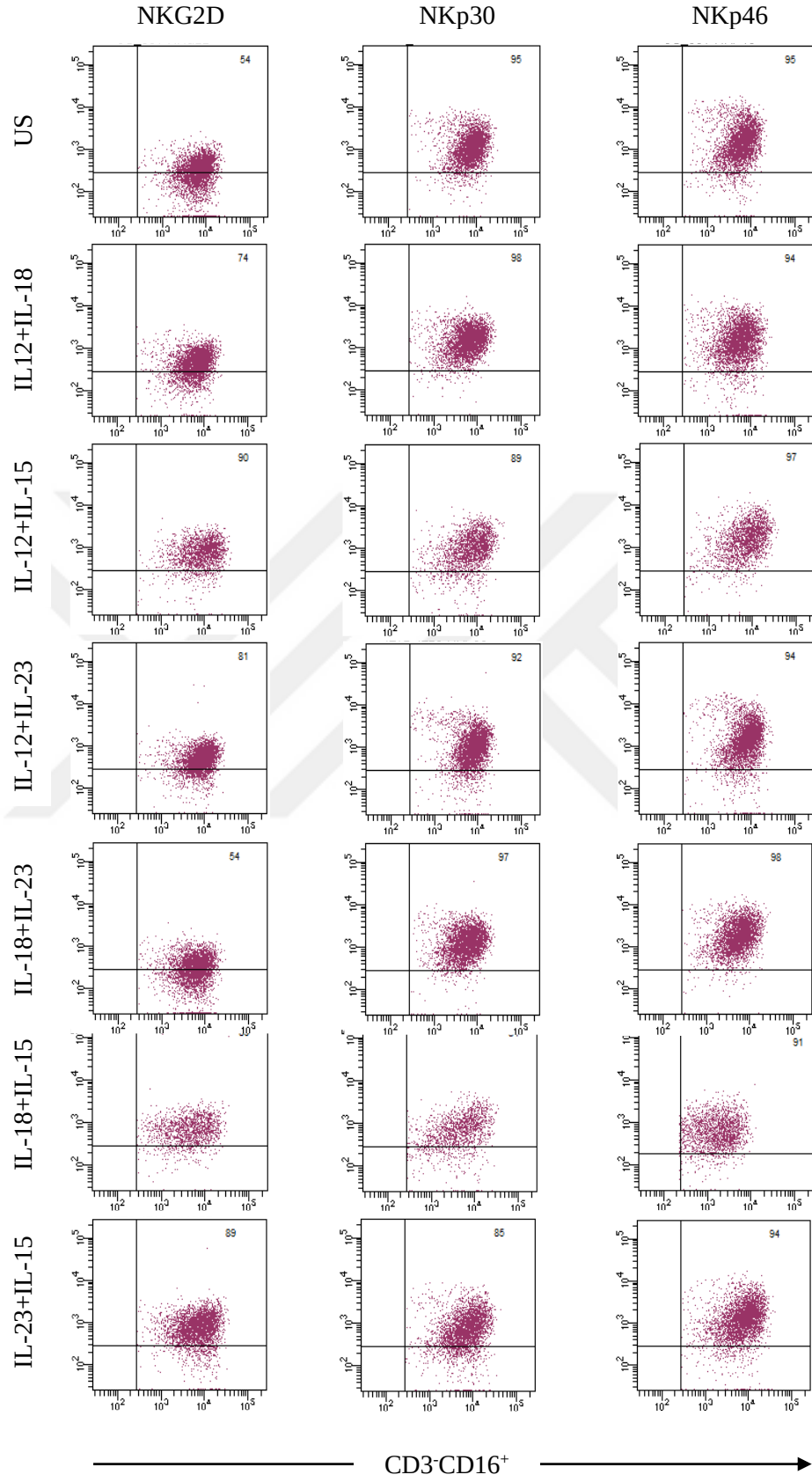


Şekil 4.16: CD3⁺CD16⁺ NK hücre grubunda farklı sitokinlerle uyarım sonrası IL-12R β 2 oranları

4.1.3.3. CD3-CD16⁺ NK Hücre Populasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 Oranları

Sağlıklı bir bireye ait analiz örneği şekil 4.17’de gösterilmiştir. PKMH izolasyonu sonrasında farklı sitokinlerle uyarıldıktan sonra akan hücre ölçer cihazında CD3 negatif olan hücre grubu seçiminin ardından, bu hücre grubu içinden CD16 pozitif hücreler seçilerek NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranları tespit edilmiştir.

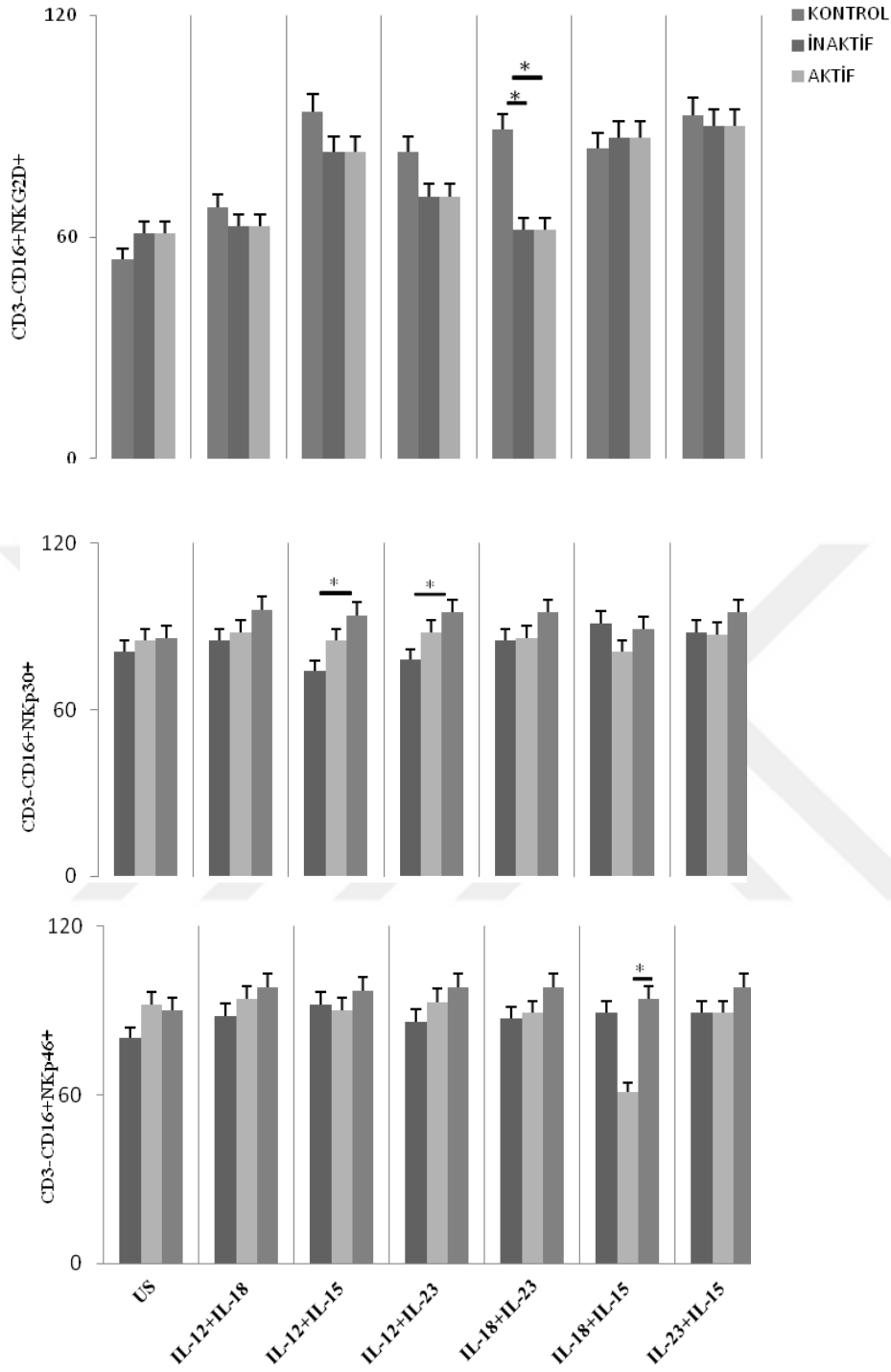




Şekil 4.17: CD3⁺CD16⁺ NK hücre popülasyonunda NKG2D, NKp30 ve NKp46 ifadesi

IL-18+IL-23 ile uyarımda aktif ve inaktif grup $CD3^+CD16^+NKG2D^+$ hücre oranları sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (sırasıyla, $p=0.004$, $p=0.004$) (Şekil 4.14). IL-12+IL-15 ve IL-12+IL-23 ile uyarım sonucu aktif grup $CD3^+CD16^+NKp30^+$ NK hücre oranlarında sağlıklı kontrol grubuna göre artış saptanmıştır (sırasıyla, $p=0.008$ ve $p=0.009$) (Şekil 4.18). Benzer şekilde, inaktif grup $CD3^+CD16^+NKp46^+$ NK hücre düzeylerinin de IL-18+IL-15 sitokin kombinasyonu ile uyarım sonucu aktif gruba oranla düşük seviyede olduğu gözlenmiştir ($p=0.02$) (Şekil 4.18).



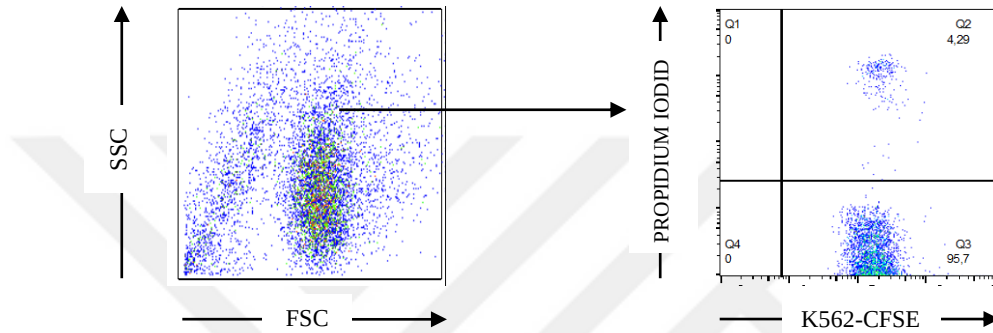


Şekil 4.18: Hasta ve kontrol gruplarında CD3⁺16⁺NKG2D⁺, CD3⁺16⁺NKp30⁺ ve CD3⁺16⁺NKp46⁺ NK hücre oranları

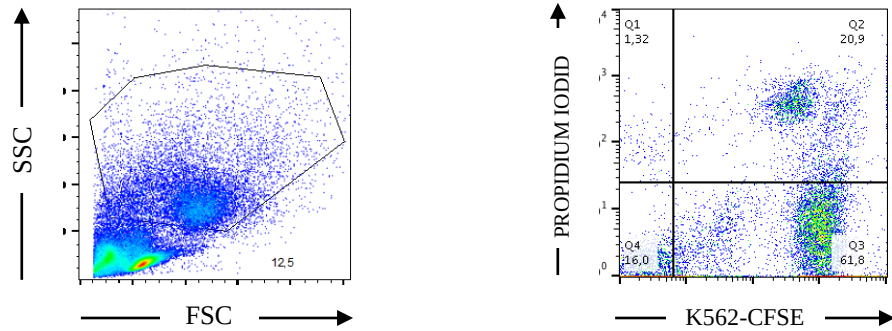
4.2. Behçet Hastalarında NK Hücre Sitotoksik Aktivitesi

Aktif ve inaktif dönemindeki Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen PKMH'ler, CFSE ile işaretlenen K562 hücreleri ile birlikte kültüre alınmış (efektör/hedef : 10/1), kültür sonrası propidium iodid ile boyanan K562 hücreleri akan

hücre ölçerde kapılanarak, Propidium Iodid ile boyanan hücrelerin oranı belirlenmek suretiyle, NK hücre sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Şekil 4.19’da sağlıklı bir bireyin K562 ile uyarılmamış, Şekil 4.20’de ise K562 ile uyarımlı PKMH’lerinden akan hücre ölçer sonuçları gösterilmiştir. Sitotoksik aktivite K562 ile uyarımlı ve uyarımsız hücre oranları arasındaki fark ile belirlenmektedir. Aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları ile sağlıklı kontrol grupları arasında sitotoksik aktivite yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.19).

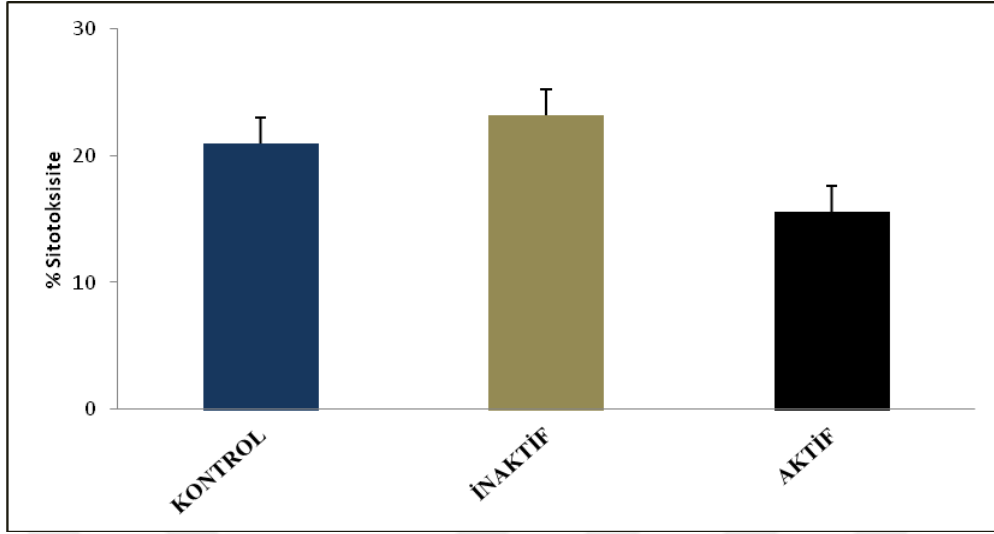


Şekil 4.19: PKMH'lerin US durumda sitotoksik aktivitelerinin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi



Şekil 4-20: PKMH'lerin K562 ile uyarım sonrası sitotoksik aktivitenin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi

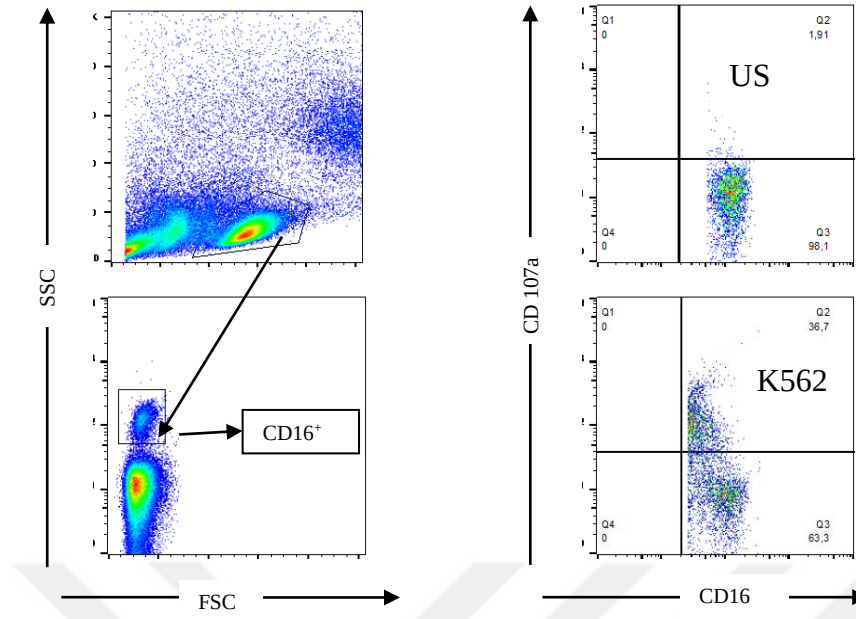
Sağlıklı kontrol, aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hastaları arasında sitotoksik aktivite açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.20: Aktif ve inaktif hastaları ile sağlıklı kontrol gruplarında sitotoksik aktivite

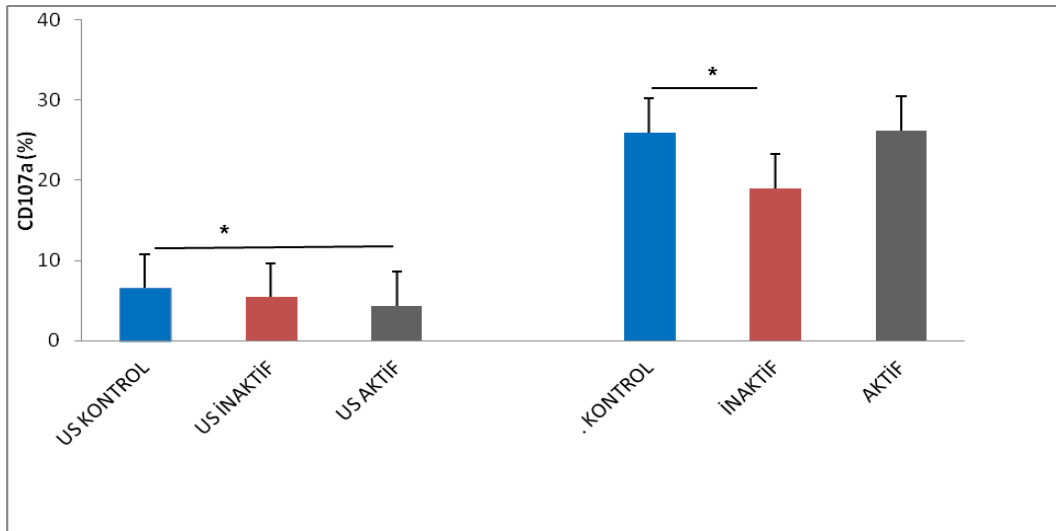
4.3. Behçet Hastalarında CD107a Degranülasyonu

CD16⁺ hücrelerin sitotoksik potansiyellerini değerlendirmek amacıyla CD107a degranülasyon oranı araştırılmıştır. Stimülasyonsuz koşulda ve K562 ile uyarım sonrası CD107a ifade oranları incelendiğinde, aktif ve inaktif dönemdeki Behçet hasta grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Uyarımın olmadığı koşullarda aktif gruptaki CD107a ifadesinin sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0.006$). K562 ile uyarım sonrasında ise, inaktif gruptaki NK hücrelerinde CD107a oranının sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir ($p=0.02$).



Şekil 4.21: Akan hücre ölçer cihazında CD107a analizinin değerlendirilmesi

K562 ile uyarım sonrası aktif ve inaktif grup CD107a oranlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre ise, stimülasyonsuz koşulda aktif grubundaki CD107a ifadesinde azalma olduğu saptanmıştır ($p=0.006$). K562 ile uyarım sonucu inaktif grup Nk hücrelerindeki CD107a ekspresyonunun kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0.02$).



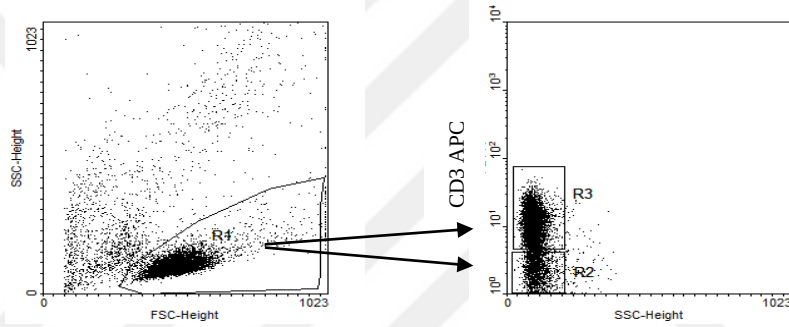
4.22: Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında US ve uyarım sonucu CD107a düzeylerinin karşılaştırılması

4.4. Behçet Hastalarında Lenfositlerin Proliferatif Yanıtları

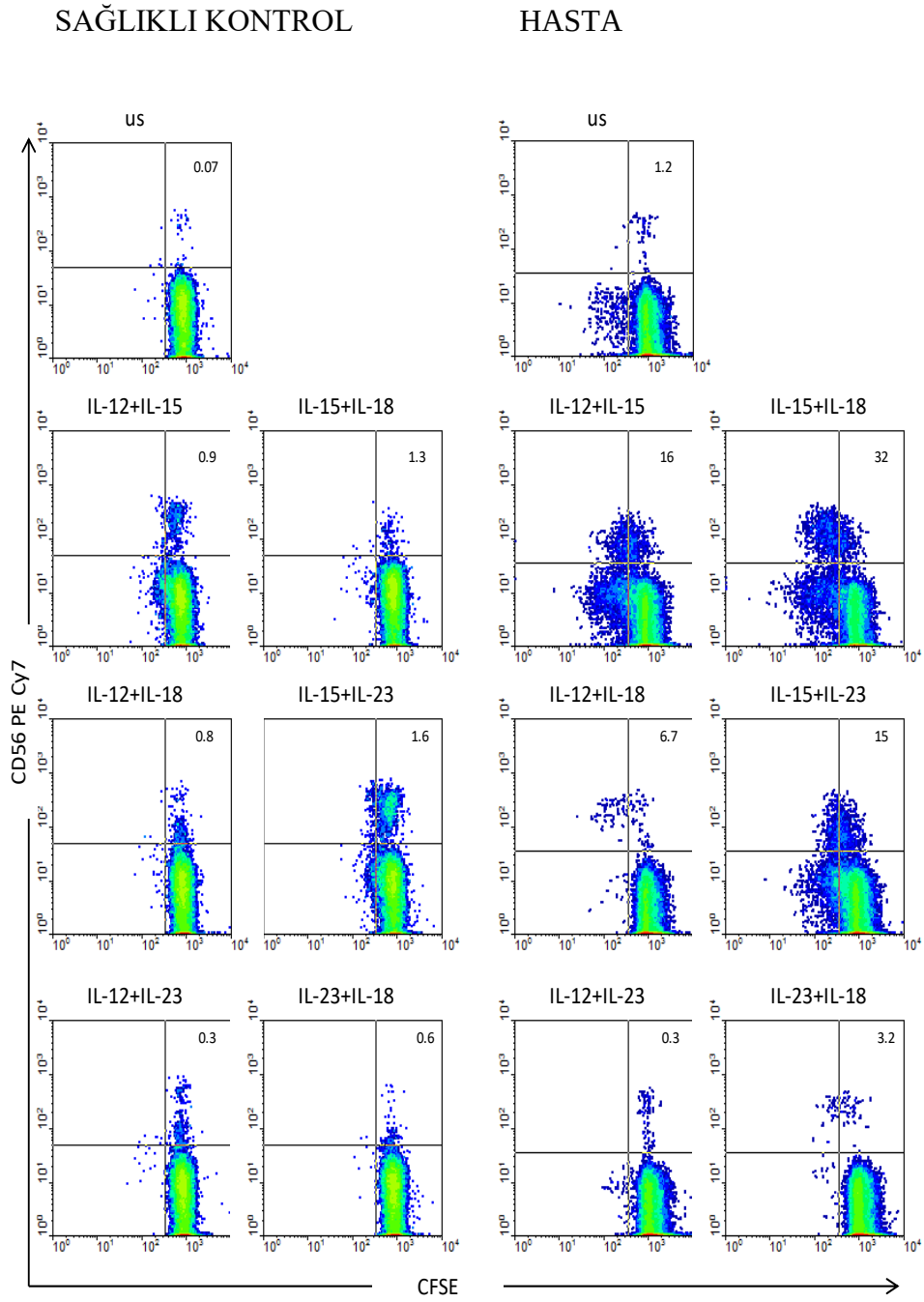
Aktif, inaktif ve sağlıklı kontrol gruplarında $CD3^-CD56^+$ NK ve $CD3^+$ T hücre proliferasyon kapasiteleri, CFSE ile işaretlenmiş PKMH'lerin farklı sitokin kombinasyonları varlığında kültürü sonucu akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir.

4.4.1. $CD3^-CD56^+$ NK Hücre Proliferasyonu

Farklı koşullarda yapılan kültür sonrası PKMH'ler içerisinde ilk önce total lenfosit popülasyonu, ardından $CD3^-$ hücre popülasyonunun kapılanması suretiyle, bu hücreler içinden $CD56$ ifade eden NK hücreleri tespit edilmiştir. Ardından, $CD3^-CD56^+$ hücrelerin CFSE ifadeleri değerlendirilerek, proliferatif yanıtları analiz edilmiştir (Şekil 4. 23).



Şekil 4.23: Lenfosit (R1), $CD3^-$ (R2) ve $CD3^+$ (R3) hücrelerinin kapılama stratejisi

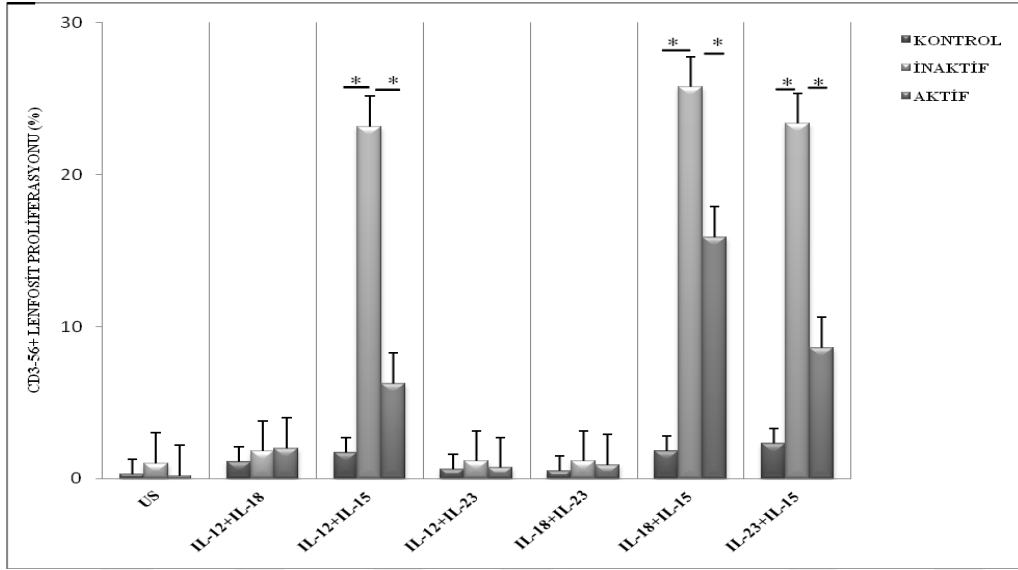


Şekil 4.24: Aktif, inaktif ve sağlıklı kontrol gruplarında CD3⁻CD56⁺ NK hücrelerinin sitokin uyarımları sonucu proliferatif yanıtları

Aktif-inaktif grupları arasında lenfositlerin IL-12+IL-15 ile uyarım sonucunda inaktif dönemdeki Behçet hastalarının NK hücre proliferasyon kapasitelerinin aktif gruba göre artış gösterdiği saptanmıştır ($p=0.04$). Aktif-kontrol grubunda ise, inaktif

dönemdeki hastaların proliferasyon kapasitelerinde kontrol dönemine göre artış olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

İnaktif ve kontrol grubunda ise, lenfositlerin IL-12+IL-18, IL-12+IL-15, IL-18+IL-23, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 sitokin kombinasyonları ile uyarıldığında inaktif grupta kontrol grubuna göre NK hücre proliferasyonunda artış saptanmıştır (sırasıyla, $p=0.04$, 0.03 , 0.03 , 0.03 , 0.03 ve 0.03).



Şekil 4.25: Hasta ve kontrol grupları proliferative kapasitelerinin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi

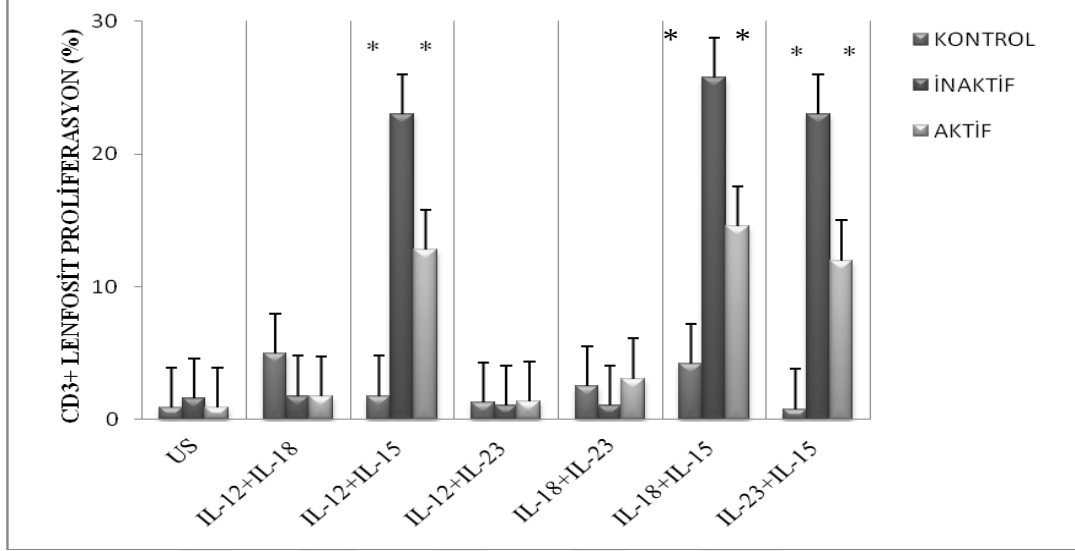
4.4.2. CD3⁺ T Lenfosit Proliferasyonu

Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grubu PKMH'leri farklı sitokin kombinasyonları ile uyarıldıktan sonra, CD3⁺ T lenfositlerinin proliferatif yanıtları akan hücre ölçer yöntemiyle incelenmiştir.

IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 uyarımlarına cevaben aktif grup CD3⁺ T hücrelerinin proliferasyon kapasitesinin sağlıklı kontrollere göre yükselme eğiliminde olduğu gözlenmekle birlikte, istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

İnaktif grupta ise, IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 ile uyarılmış koşullarda CD3⁺ T hücrelerinin proliferatif yanıtlarında daha büyük bir artış gözlenmiş ve sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla, $p=0.03$, $p=0.03$ ve $p=0.04$).

IL-18+IL-23 ile uyarımı takiben, aktif gruptaki CD3⁺ T lenfosit proliferasyonunun, inaktif gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0.03).



Şekil 4.26: Kontrol, inaktif ve aktif gruplarında CD3⁺ T lenfositlerin sitokin uyarımları sonucunda proliferatif yanıtlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Genital ülserler, oral aftoid lezyonlar, deri lezyonları, üveitlerin tekrarlayan ataklarıyla karakterize BH multi-sistemik enflamatuvar bir hastalıktır [217]. BH'nin etyopatogenezi tam olarak açıklanamamasına karşın yapılan çalışmalar, genetik yatkınlığı olan bireylerde Th1 yönündeki immün cevapların, sitotoksik CD8⁺ T lenfositlerin ve NK hücre anomalitelerinin patogeneizde rol oynayabileceğini göstermektedir [218-220].

Çalışmamızda, sağlıklı bireylere ve Behçet hastalarına ait PKMH örnekleri farklı sitokin kombinasyonlarıyla uyarılarak CD16⁺, CD8⁺ ve CD4⁺ lenfosit populasyonlarında IL-12RB2, CD69 ve aktive edici NK hücre reseptör (NKG2D, NKp30 ve NKp46) ifadelerinin yanısıra, lenfosit proliferasyon kapasiteleri, CD107a degranülasyonu ve sitotoksik yetenekleri fonksiyonel açıdan incelenmiştir.

Magareta P ve arkadaşları çalışmalarında, sağlıklı bireylerin PKMH'lerinin IL-15 ile uyarım sonrası CD8⁺ T hücrelerinde NKG2D ifadesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir [221]. Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonları kullanıldığında CD8⁺NKG2D⁺ T hücre oranlarında artış saptanmıştır. NKG2D reseptörünün NK hücreleri ve CD8⁺ T hücrelerinde yüksek, CD4⁺ T hücrelerinde ise çok az ifade edildiğini gösteren çalışmaya benzer şekilde [222], çalışmamızda, CD8⁺ T lenfositlerinde NKG2D oranı % 42, CD4⁺ T lenfositlerde ise % 0.5 olarak belirlenmiştir.

NKG2D, NK hücrelerinde direkt olarak uyarıcı reseptör görevini, T hücrelerinde ise koreseptör olarak görev görmektedir [223]. NKG2D genini silme (knock-out) ya da antikör ile bloklama çalışmalarından elde edilen sonuçlar, NKG2D'nin otoimmün ve enflamatuvar hastalıklarda rol oynayabileceğini göstermiştir [224]. Romatoid artrit ile bazı kanser türlerinde CD4⁺NKG2D⁺ lenfosit oranlarında artış olduğu saptanmıştır [225]. Kronik enfeksiyonlarda ve bazı otoimmün hastalıklarda NKG2D ifade eden CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin sıklıklarında artış bildirilmiştir [226]. Çalışmamızda uyarımsız ve sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucunda Behçet hastaları ve sağlıklı bireylerde NKG2D oranları incelendiğinde, NKG2D taşıyan CD8⁺ T lenfosit sıklıklarında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hasta ve sağlıklı bireyler arasında uyarımsız koşulda CD4⁺ T hücrelerde NKG2D oranının

farklılık göstermemesine karşılık, IL-15 sitokin kombinasyonları ile uyarım sonucunda inaktif grupta diğer gruplara göre artış gözlenmiştir. Çalışmamızda uyarımsız koşulda hem aktif hem de inaktif Behçet hasta grubundaki $CD3^+CD16^+NKG2D^+$ lenfositlerde kontrol grubuna göre düşüklük saptanmıştır. Sağlıklı bireylerde tüm sitokin kombinasyonları ile uyarımlar sonucu $CD3^+CD16^+NKG2D^+$ reseptör oranlarında artış meydana gelirken, IL-8+IL-23 ile uyarım sonucunda hasta gruplarında kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir.

NK hücreleri ile diğer immün hücreler arasında etkileşimler oluşabilmektedir. Nötrofiller ve monositler, proenflamatuvar sitokinlerle ya da toll-benzeri reseptör ligandlarıyla uyarıldığında NKp30 bağlacı olan B7-H6 ligandı ifade etmeye başlarlar. NK hücreleri tarafından sitokinler salgılanmakta ve sitotoksik faaliyetler sonucu, BH'de NKp30 reseptörünün NK-DH etkileşimine aracılık ederek immün regülasyonda önemli rol oynayabileceği öngörülmüştür. Çalışmamızda, uyarımsız şartlarda $CD8^+NKp30^+$ hücre oranı kontrol grubunda % 1, inaktif grupta % 3.4 ve aktif grupta % 0.7 olarak saptanmış, gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Behçet hasta gruplarında $CD3^+CD16^+NKp30^+$ oranlarında uyarımsız koşullarda anlamlı bir fark görülmemesine karşılık, IL-12+IL-15 ve IL-12+IL-23 uyarımları sonucunda, kontrol grubunda aktif Behçet hasta grubuna göre $CD3^+CD16^+NKp30^+$ oranında düşüş saptanmıştır [227, 228] .

NK-nötrofil arasındaki etkileşim NKp46 aracılığıyla oluşmaktadır. NK hücre yüzeyindeki NKp46 reseptörünün nötrofillerde bulunan ligandına bağlanması, doku hasarının engellenmesi ve enflamasyonun sonlanması için gerekli olan nötrofil apoptozisi ile sonuçlanmaktadır [229]. Fare çalışmalarında gösterilen NKp46 reseptör eksikliğinin hücrelerde apoptozisi sağlayan TRAIL molekülünün ifadesinin kaybına neden olduğu gösterilmiştir [230]. Ayrıca Fujimori ve arkadaşları, Behçet hastalığının inaktif dönemde nötrofillerin apoptozise dirençli olduğunu göstermişlerdir [231]. NKp46 ve apoptozis arasında gösterilen ilişki, NKp46 ifadesinde azalma olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda $CD3^+CD16^+NKp46^+$ hücre oranlarında uyarımsız koşulda anlamlı bir fark saptanmamış, IL-18+IL-15 ile uyarım sonucunda ise, $CD3^+CD16^+NKp46^+$ hücre oranında inaktif Behçet hasta grubunda aktif Behçet hasta grubuna göre azalma görülmüştür. Uyarımsız koşulda inaktif grupta artış gösteren $CD8^+NKp46^+$ hücre grubu; IL-23'ün dâhil olduğu sitokin kombinasyonlarıyla uyarım sonucunda $CD8^+NKp46^+$ hücre grubunda düşüşe neden olmuştur. Bulgularımız, inaktif Behçet

hastalarında uyarımsız durumda saptanan yüksek NKp46 oranının CD8⁺ T lenfositlerinde, apoptozis dışında başka rolleri olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız Behçet hastalarının lenfosit alt gruplarında sitokin uyarımlarıyla birlikte NKG2D, NKp30 ve NKp46 oranlarını saptayan ilk çalışmadır.

CD69, farklı immün hücrelerin aktivasyonu sonucunda hücre yüzeyinde ifade edilen bir belirteç olarak tarif edilmiş, fare'de CD69 gen silme çalışmaları sonucunda temel fonksiyonunun immün cevabın azaltılması olduğu gösterilmiştir [232, 233]. Ayrıca fare çalışmalarında CD69 eksikliği, enflamatuvar otoimmün hastalıklarda, doku hasarında, Th1 ve Th17 lenfositlerin dokulara göçünde artışa neden olmuştur [234].

Çalışmamızda, Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollerin PKMH'leri sitokinlerle aktive edildikten sonra lenfosit alt gruplarında CD69 oranları analiz edilmiştir. PKMH'ler IL-12+IL-18, IL-12+IL-15, IL-18+IL-23, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 ile uyarıldığında, hasta ve kontrol gruplarında CD69 oranında artış saptanmıştır. IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonlarına cevap olarak inaktif dönemdeki hastalarda hem aktif hem de kontrol grubuna göre CD69 ifadesi artış göstermiş ve IL-18+IL-15 ile uyarım sonucu en güçlü aktivasyon oranı belirlenmiştir.

CD4⁺CD69⁺ T hücre grubunun T düzenleyici hücre gibi davrandığı tarif edilmiş, efektör lenfositlerin çoğalmasını ve aktivasyonu baskılayabileceği gösterilmiştir [235]. Kronik periodontitli hastaların periferik kanında CD4⁺CD69⁺ T hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır [236]. Çalışmamızda uyarımsız koşulda, inaktif Behçet grubunda aktif gruba göre düşüklük görülmesine karşılık, IL-15'in dahil olduğu sitokin kombinasyonlarıyla uyarım sonucunda CD4⁺CD69⁺ T hücreleri inaktif gruba göre önemli derecede artış göstermiştir.

CD8⁺CD69⁺ lenfositler ile ilişkili literatür bilgileri sınırlıdır. Çalışmamızda CD8⁺CD69⁺ lenfosit popülasyonu uyarımsız koşulda, aktif Behçet hastalarında (% 11), inaktif ve kontrol grubuna göre (% 2) yüksek saptanmıştır. IL-18+IL-15 ile uyarım neticesinde, CD8⁺CD69⁺ lenfosit oranı kontrol grubunda 15 kat, inaktif Behçet hasta grubunda ise 35 kat artış göstermiştir. B. Hervier ve arkadaşları, sistemik lupus eritematosus hastalarının periferik kanında CD8⁺CD69⁺ T lenfosit oranının artmış olduğunu ve farklı hücrelerin apoptozisini arttırabileceğini göstermişlerdir [237, 238].

Yamaguchi Y ve arkadaşları da, aktif dönem Behçet hastalarındaki CD69⁺ NK hücrelerinin inaktif dönem Behçet hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre önemli derecede artış gösterdiğini bildirilmiştir [239]. Çalışmamızda, uyarımsız koşulda aktif dönem Behçet hastalarındaki CD16⁺CD69⁺ oranında inaktif ya da kontrol grubuna göre artış belirlenmemiştir.

İnsan NK hücrelerinin IL-12, IL-15 ve IL-18'in ikili kombinasyonları ile uyarımları NK hücrelerinin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Özellikle IL-15+IL-18 ile uyarımın en yüksek aktivasyonu sağladığı gösterilmiştir [240]. Syh-Jae Lin ve arkadaşları, sağlıklı bireylerin PKMH'lerinin IL-12+IL-15 ile uyarımı sonucunda CD3⁺ ve CD16⁺ hücrelerin CD69 ifade oranlarında artış göstermişlerdir [241]. Çalışmamızda sağlıklı bireylerin PKMH'lerinin farklı sitokin kombinasyonları ile uyarımları sonucu, IL-12+IL-23 ile uyarım hariç, tüm koşullarda aktivasyon saptanmıştır. En yüksek aktivasyon seviyesi ise IL-15'in dâhil olduğu sitokin kombinasyonları ile gerçekleşmiştir.

IL-12RB2 geni Behçet hastalığı için yatkınlık geni olarak bildirilmiştir [242]. IL-12 reseptörlerine (IL-12RB2) bağlanarak, naif T hücrelerden Th1 yönüne farklılaşımını sağlamaktadır [243]. IL-12RB2 ifadesinde saptanan artışın immün cevabın dengesinin Th1 yönüne kaymasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda CD4⁺ T hücrelerde IL-12RB2 ifadesi uyarımsız koşulda, kontrol grubunda % 1.8, inaktif Behçet hasta grubunda % 1 ve aktif grupta % 0.7 olarak belirlenmiş, IL-12RB2 oranında sitokin kombinasyonlarıyla uyarım sonucunda artış ya da azalış gözlenmemiştir. Kontrol ve aktivasyon gruplarında, IL-12+IL-18 ve IL-18+IL-23 sitokin uyarımları CD16⁺IL-12RB2⁺ lenfosit oranında inaktif hasta grubuna göre artışa neden olmuştur.

İmmün sistem hücrelerinin fonksiyonel aktivitelerini saptamak amacıyla CD3⁺CD56⁺ NK ve CD3⁺ T hücre proliferatif aktiviteleri incelendiğinde, IL-12+IL-15, IL-18+IL-15 ve IL-23+IL-15 ile uyarımı takiben inaktif Behçet hastalarında hem CD3⁺CD56⁺ hem de CD3⁺ hücre alt grup oranlarının kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir. IL-15 ile kombine sitokin uyarımlarına yanıt olarak Behçet hastalarında gözlenen proliferatif artış, IL-15 reseptör ve sinyal yolağında bir defekt olabileceğini düşündürmektedir. Vendrame ve arkadaşları, sağlıklı bireylerin PKMH'lerinin IL-15 ile uyarımları sonucu CD56 ifadelerinde artış saptamıştır [244].

Çalışmamız, Behçet hastalarında PKMH'lerin sitokin kombinasyonları ile uyarımına karşı proliferatif yanıtlarını inceleyen ilk çalışmadır.

CD107a, NK ve CD8⁺ T hücrelerinin degranülasyon belirtecidir [245]. BH'de, Hasan MS ve arkadaşları tarafından , aktif ve inaktif dönem Behçet hastaları ile sağlıklı kontrollerde NK hücre fonksiyonlarının incelendiği bir çalışmada BH'da CD107a ifadesinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır [246]. Çalışmamızda, NK hücre membranında CD107a ifadesi uyarımsız koşulda aktif Behçet hastalarında kontrol grubuna göre azalma göstermesine karşılık, K562 ile uyarım sonucu inaktif Behçet hasta grubunda CD107a degranülasyonunda kontrol grubuna göre düşüşe neden olmuştur.

Hamzaoui K ve arkadaşları çalışmalarında, aktif ve inaktif dönemdeki hastalarda inaktif dönemdeki hastaların sitotoksik aktivitelerinin, aktif dönem Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olduğunu saptamışlardır [220]. Önder M. ve arkadaşları ise inaktif dönemdeki Behçet hastalarında NK hücre sitotoksitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir [247]. Diğer bir çalışmada ise Behçet hasta grupları ve sağlıklı kontrol grupları arasında sitotoksik aktivite ve CD107a degranülasyonu yönünden fark saptanmamıştır [248]. Çalışmamızda, K562 hücreleri kullanılarak NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri incelendiğinde aktif ve inaktif Behçet hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte CD107a, NK hücre sitotoksikite yöntemi ile karşılaştırıldığında NK hücre aktivitesini gösteren daha duyarlı bir yöntem ve en önemli fonksiyonel sitotoksik belirteçtir [249]. Sitotoksik aktiviteler açısından literatürde bulunan sonuçların çelişkili olmasının, çalışmalara dâhil edilen Behçet hastalarının yaş, etnisite ve kullandıkları ilaç tedavileri yönünden değişkenlik göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bulgularımız, gerek CD3⁺ T ve gerekse CD3⁻ NK hücrelerinin Behçet hastalığı patogeneziindeki rolünü göstermekle birlikte, proje bütçesinin kısıtlılığı nedeniyle çalışılan hasta sayısının az olması çalışmamızın sınırlayıcı etkenlerindendir.

Hasta sayısının artırılması sonucu elde edilecek bulgular Behçet hastalığı patogeneziinde NK hücrelerin rolüne ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. L1. Lanier, L.L., NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(6): p. 575-82.
2. Pegram, H.J., et al., Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*, 2011. **89**(2): p. 216-24.
3. Bakker, A.B., et al., NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol*, 2000. **61**(1): p. 18-27.
4. Long, E.O. and S. Rajagopalan, Stress signals activate natural killer cells. *J Exp Med*, 2002. **196**(11): p. 1399-402.
5. Ljunggren, H.G. and K. Karre, In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 1990. **11**(7): p. 237-44.
6. Bryceson, Y.T., H.G. Ljunggren, and E.O. Long, Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*, 2009. **114**(13): p. 2657-66.
7. Bryceson, Y.T., et al., Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 73-91.
8. Bryceson, Y.T., et al., Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 159-66.
9. Ortaldo, J.R., et al., Regulation of ITAM-positive receptors: role of IL-12 and IL-18. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1468-75.
10. Biron, C.A., et al., Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 189-220.
11. Salazar-Mather, T.P., R. Ishikawa, and C.A. Biron, NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. *J Immunol*, 1996. **157**(7): p. 3054-64.
12. Trinchieri, G., Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 1989. **47**: p. 187-376.
13. Lieberman, L.A. and C.A. Hunter, Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. *Microbes Infect*, 2002. **4**(15): p. 1531-8.
14. Nguyen, K.B., et al., Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4279-87.
15. Ferlazzo, G., et al., Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 343-51.
16. Spaggiari, G.M., et al., NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon

- ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(6): p. 1656-65.
17. Thoren, F.B., et al., Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J Immunol*, 2012. **188**(4): p. 1668-74.
 18. Freysdottir, J., et al., Diversity of gammadelta T cells in patients with Behcet's disease is indicative of polyclonal activation. *Oral Dis*, 2006. **12**(3): p. 271-7.
 19. Kaneko, F., et al., Natural killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behcet's disease. *Br J Dermatol*, 1985. **113**(3): p. 313-8.
 20. Onder, M., et al., Natural cellular cytotoxicity in Behcet's disease. *J Dermatol*, 1994. **21**(4): p. 239-43.
 21. Kirino, Y., et al., Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet*, 2013. **45**(2): p. 202-7.
 22. Behcet, H. and E.L. Matteson, On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937. *Clin Exp Rheumatol*, 2010. **28**(4 Suppl 60): p. S2-5.
 23. Bonfioli, A.A. and F. Orefice, Behcet's disease. *Semin Ophthalmol*, 2005. **20**(3): p. 199-206.
 24. Yazici, H., et al., The ten-year mortality in Behcet's syndrome. *Br J Rheumatol*, 1996. **35**(2): p. 139-41.
 25. Kural-Seyahi, E., et al., The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore)*, 2003. **82**(1): p. 60-76.
 26. Evereklioglu, C., Current concepts in the etiology and treatment of Behcet disease. *Surv Ophthalmol*, 2005. **50**(4): p. 297-350.
 27. Coskun, B., et al., Activation markers in Behcet's disease. *Skinmed*, 2005. **4**(5): p. 282-6.
 28. Yurdakul, S. and H. Yazici, Behcet's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008. **22**(5): p. 793-809.
 29. Sakane, T., et al., Behcet's disease. *N Engl J Med*, 1999. **341**(17): p. 1284-91.
 30. Altenburg, A., et al., [Epidemiology and clinical manifestations of Adamantiades-Behcet disease in Germany -- current pathogenetic concepts and therapeutic possibilities]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2006. **4**(1): p. 49-64; quiz 65-6.
 31. Tugal-Tutkun, I., Behcet disease in the developing world. *Int Ophthalmol Clin*, 2010. **50**(2): p. 87-98.
 32. Kim, D.K., et al., Clinical analysis of 40 cases of childhood-onset Behcet's disease. *Pediatr Dermatol*, 1994. **11**(2): p. 95-101.
 33. Yazici, Y., S. Yurdakul, and H. Yazici, Behcet's syndrome. *Curr Rheumatol Rep*, 2010. **12**(6): p. 429-35.
 34. Bang, D., et al., Influence of sex on patients with Behcet's disease in Korea. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **528**: p. 59-63.

35. Fei, Y., et al., Identification of novel genetic susceptibility loci for Behcet's disease using a genome-wide association study. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(3): p. R66.
36. de Menthon, M., et al., HLA-B51/B5 and the risk of Behcet's disease: a systematic review and meta-analysis of case-control genetic association studies. *Arthritis Rheum*, 2009. **61**(10): p. 1287-96.
37. Wallace, G.R. and E. Niemczyk, Genetics in ocular inflammation--basic principles. *Ocul Immunol Inflamm*, 2011. **19**(1): p. 10-8.
38. Verity, D.H., et al., Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*, 1999. **54**(3): p. 213-20.
39. Pineton de Chambrun, M., et al., New insights into the pathogenesis of Behcet's disease. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(10): p. 687-98.
40. Mizuki, N., et al., Association of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A and HLA-B Alleles with Behcet's Disease in Turkey. *Jpn J Ophthalmol*, 2007. **51**(6): p. 431-6.
41. Bahram, S., et al., A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(14): p. 6259-63.
42. Collins, R.W., et al., High resolution molecular phototyping of MICA and MICB alleles using sequence specific primers. *Hum Immunol*, 2002. **63**(9): p. 783-94.
43. Wei, F., Y.U. Zhang, and W. Li, A meta-analysis of the association between Behcet's disease and MICA-A6. *Biomed Rep*, 2016. **4**(6): p. 741-745.
44. Takeuchi, M., D.L. Kastner, and E.F. Remmers, The immunogenetics of Behcet's disease: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 2015. **64**: p. 137-48.
45. Gul, A., Pathogenesis of Behcet's disease: autoinflammatory features and beyond. *Semin Immunopathol*, 2015. **37**(4): p. 413-8.
46. Saric, T., et al., An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol*, 2002. **3**(12): p. 1169-76.
47. Reeves, E., et al., Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity. *J Immunol*, 2013. **191**(1): p. 35-43.
48. Mizuki, N., et al., Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 703-6.
49. Remmers, E.F., et al., Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 698-702.
50. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 2003. **19**(5): p. 641-4.

51. Kirino, Y., et al., Targeted resequencing implicates the familial Mediterranean fever gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(20): p. 8134-9.
52. Renedo, M., et al., A sequence-ready physical map of the region containing the human natural killer gene complex on chromosome 12p12.3-p13.2. *Genomics*, 2000. **65**(2): p. 129-36.
53. Karasneh, J., et al., Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behcet's disease. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(6): p. 1836-42.
54. Hayashi, T., et al., Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 563-70.
55. Akman, A., et al., Relationship between periodontal findings and the TNF-alpha Gene 1031T/C polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008. **22**(8): p. 950-7.
56. Alayli, G., et al., T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behcet's disease. *Clin Rheumatol*, 2007. **26**(8): p. 1299-305.
57. Dilek, K., et al., Cytokine gene polymorphisms in Behcet's disease and their association with clinical and laboratory findings. *Clin Exp Rheumatol*, 2009. **27**(2 Suppl 53): p. S73-8.
58. Alipour, S., et al., Epigenetic alterations in chronic disease focusing on Behcet's disease: Review. *Biomed Pharmacother*, 2017. **91**: p. 526-533.
59. Kaneko, F., et al., The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behcet's Disease. *Eur J Dermatol*, 2008. **18**(5): p. 489-98.
60. Mumcu, G., et al., Oral health related quality of life is affected by disease activity in Behcet's disease. *Oral Dis*, 2006. **12**(2): p. 145-51.
61. Yokota, K., et al., Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Microbiol Immunol*, 1995. **39**(9): p. 729-32.
62. Isogai, E., et al., Antimicrobial activity of synthetic human CAP18 peptides to *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **528**: p. 195-200.
63. Hirohata, S., H. Oka, and Y. Mizushima, Streptococcal-related antigens stimulate production of IL6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behcet's disease. *Cell Immunol*, 1992. **140**(2): p. 410-9.
64. Mochizuki, M., et al., Fine antigen specificity of human gamma delta T cell lines (V gamma 9+) established by repetitive stimulation with a serotype (KTH-1) of a gram-positive bacterium, *Streptococcus sanguis*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(7): p. 1536-43.
65. Yoshikawa, K., et al., Cloning and sequencing of BeS-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behcet's disease. *Zentralbl Bakteriell*, 1998. **287**(4): p. 449-60.

66. Hirohata, S. and T. Hashimoto, Abnormal T cell responses to bacterial superantigens in Behcet's disease (BD). *Clin Exp Immunol*, 1998. **112**(2): p. 317-24.
67. Fresko, I., et al., Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Behcet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. **23**(4 Suppl 38): p. S67-70.
68. Zierhut, M., et al., Immunology and functional genomics of Behcet's disease. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(9): p. 1903-22.
69. Ergun, T., et al., HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease. *J Am Acad Dermatol*, 2001. **45**(6): p. 904-9.
70. Imamura, Y., et al., Involvement of Th1 cells and heat shock protein 60 in the pathogenesis of intestinal Behcet's disease. *Clin Exp Immunol*, 2005. **139**(2): p. 371-8.
71. Kaneko, S., et al., Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behcet's disease (BD) in Japan. *Clin Exp Immunol*, 1997. **108**(2): p. 204-12.
72. Direskeneli, H., et al., T cell responses to 60/65 kDa heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behcet's disease. *J Rheumatol*, 2000. **27**(3): p. 708-13.
73. Lehner, T., The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behcet's disease. *Int Rev Immunol*, 1997. **14**(1): p. 21-32.
74. Lehner, T., Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Ann Med Interne (Paris)*, 1999. **150**(6): p. 483-7.
75. Saruhan-Direskeneli, G., et al., Human HSP 60 peptide responsive T cell lines are similarly present in both Behcet's disease patients and healthy controls. *Immunol Lett*, 2001. **79**(3): p. 203-8.
76. Kapsimali, V.D., et al., Etiopathogenesis of Behcet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. *Clin Rheumatol*, 2010. **29**(11): p. 1211-6.
77. Li, B., et al., T-bet expression is upregulated in active Behcet's disease. *Br J Ophthalmol*, 2003. **87**(10): p. 1264-7.
78. Frassanito, M.A., et al., Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(9): p. 1967-74.
79. Neves, F.S. and F. Spiller, Possible mechanisms of neutrophil activation in Behcet's disease. *Int Immunopharmacol*, 2013. **17**(4): p. 1206-10.
80. Lim, S.D., et al., Abnormalities of T-cell subsets in Behcet's syndrome. *Arch Dermatol*, 1983. **119**(4): p. 307-10.
81. Chi, W., et al., Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(7): p. 3058-64.
82. E., A., Behçet Hastalığı: Etiyopatogeneizde Güncel Bilgiler. 2013. **7**: p. 41-5.
83. Mendoza-Pinto, C., et al., Etiopathogenesis of Behcet's disease. *Autoimmun Rev*, 2010. **9**(4): p. 241-5.

84. Mendes, D., et al., Behcet's disease--a contemporary review. *J Autoimmun*, 2009. **32**(3-4): p. 178-88.
85. Hamzaoui, K., et al., Phenotype and functional profile of T cells expressing gamma delta receptor from patients with active Behcet's disease. *J Rheumatol*, 1994. **21**(12): p. 2301-6.
86. Verjans, G.M., et al., Vgamma9Vdelta2 T cells recovered from eyes of patients with Behcet's disease recognize non-peptide prenyl pyrophosphate antigens. *J Neuroimmunol*, 2002. **130**(1-2): p. 46-54.
87. Carletto, A., et al., Changes of neutrophil migration without modification of in vitro metabolism and adhesion in Behcet's disease. *J Rheumatol*, 1997. **24**(7): p. 1332-6.
88. Pay, S., et al., Immunopathogenesis of Behcet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. *Rheumatol Int*, 2007. **27**(5): p. 417-24.
89. Akman A, A.E., Behçet hastalığı: Etyopatogenezde güncel bilgiler. *Turkderm*, 2009. **43**((Suppl.2)): p. 32-8.
90. Zouboulis, C.C. and T. May, Pathogenesis of Adamantiades-Behcet's disease. *Med Microbiol Immunol*, 2003. **192**(3): p. 149-55.
91. Sahin, S., et al., Monocyte activity in Behcet's disease. *British Journal of Rheumatology*, 1996. **35**(5): p. 424-429.
92. Yamaguchi, Y., et al., Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(3): p. R80.
93. Curnow, S.J., et al., Serum cytokine profiles in Behcet's disease: is there a role for IL-15 in pathogenesis? *Immunol Lett*, 2008. **121**(1): p. 7-12.
94. Nagafuchi, H., et al., Excessive expression of Txk, a member of the Tec family of tyrosine kinases, contributes to excessive Th1 cytokine production by T lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol*, 2005. **139**(2): p. 363-70.
95. Ohno, S., et al., Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. *Arch Ophthalmol*, 1982. **100**(9): p. 1455-8.
96. Gheita, T.A., et al., Clinical significance of serum interleukin-23 and A/G gene (rs17375018) polymorphism in Behcets disease: Relation to neuro-Behcet, uveitis and disease activity. *Joint Bone Spine*, 2015. **82**(3): p. 213-5.
97. Hamzaoui, K., et al., Levels of IL-15 in serum and cerebrospinal fluid of patients with Behcet's disease. *Scand J Immunol*, 2006. **64**(6): p. 655-60.
98. Clemente, A., et al., Phenotype markers and cytokine intracellular production by CD8+ gammadelta T lymphocytes do not support a regulatory T profile in Behcet's disease patients and healthy controls. *Immunol Lett*, 2010. **129**(2): p. 57-63.
99. Janeway, C.A., Jr., How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7461-8.

100. Pashine, A., N.M. Valiante, and J.B. Ulmer, Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*, 2005. **11**(4 Suppl): p. S63-8.
101. Kiessling, R., et al., "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 1975. **5**(2): p. 117-21.
102. Colucci, F., M.A. Caligiuri, and J.P. Di Santo, What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(5): p. 413-25.
103. Hackett, J., Jr., et al., Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(10): p. 3427-31.
104. Bhat, R., et al., Fine-tuning of immune responses by SLAM-related receptors. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(3): p. 417-24.
105. Tabiasco, J., et al., Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. *Placenta*, 2006. **27 Suppl A**: p. S34-9.
106. Foley, B., et al., The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT). *Immunol Rev*, 2014. **258**(1): p. 45-63.
107. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
108. Mandal, A. and C. Viswanathan, Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2015. **8**(2): p. 47-55.
109. Topham, N.J. and E.W. Hewitt, Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 2009. **128**(1): p. 7-15.
110. Krzewski, K., et al., LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 2013. **121**(23): p. 4672-83.
111. Lieberman, J. and Z. Fan, Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(5): p. 553-9.
112. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
113. Smyth, M.J., et al., Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*, 2005. **42**(4): p. 501-10.
114. Fauriat, C., et al., Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
115. Wang, R., et al., Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*, 2012. **91**(2): p. 299-309.
116. Matikainen, S., et al., IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(7): p. 2236-45.

117. Vivier, E., et al., Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
118. Vitale, M., et al., NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 566-71.
119. Wang, H., et al., Important role for NKp30 in synapse formation and activation of NK cells. *Immunol Invest*, 2012. **41**(4): p. 367-81.
120. Warren, H.S., et al., Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5144-52.
121. Loza, M.J., et al., Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1273-81.
122. Deguine, J. and P. Bousso, Dynamics of NK cell interactions in vivo. *Immunol Rev*, 2013. **251**(1): p. 154-9.
123. Karre, K., NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol*, 2002. **55**(3): p. 221-8.
124. Karre, K., Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 477-80.
125. Lanier, L.L., G. Yu, and J.H. Phillips, Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol*, 1991. **146**(5): p. 1571-6.
126. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
127. Agaoglu, S., et al., Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1776-83.
128. Meazza, R., et al., Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 861920.
129. Jalah, R., et al., The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. *J Biol Chem*, 2013. **288**(9): p. 6763-76.
130. Loza, M.J. and B. Perussia, The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 88-96.
131. Presky, D.H., et al., A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 14002-7.
132. Gubler, U. and D.H. Presky, Molecular biology of interleukin-12 receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **795**: p. 36-40.
133. Presky, D.H., et al., Evidence for multiple sites of interaction between IL-12 and its receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **795**: p. 390-3.

134. Kaplan, M.H., et al., Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 1996. **382**(6587): p. 174-7.
135. Budagian, V., et al., IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(4): p. 259-80.
136. Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 14-32.
137. Waldmann, T.A. and Y. Tagaya, The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 19-49.
138. Mattei, F., et al., IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1179-87.
139. Fawaz, L.M., E. Sharif-Askari, and J. Menezes, Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study. *J Immunol*, 1999. **163**(8): p. 4473-80.
140. Tran, P., et al., Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology*, 2003. **109**(2): p. 263-70.
141. Carroll, H.P., V. Paunovic, and M. Gadina, Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(9): p. 1269-77.
142. Allavena, P., et al., IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(6): p. 729-35.
143. Mrozek, E., P. Anderson, and M.A. Caligiuri, Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 2632-40.
144. Ranson, T., et al., IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4887-93.
145. Mortier, E., et al., IL-15/Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1213-25.
146. McInnes, I.B., et al., Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med*, 1997. **3**(2): p. 189-95.
147. Bulfone-Paus, S., et al., Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1124-8.
148. Giri, J.G., et al., IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol*, 1995. **57**(5): p. 763-6.
149. Ring, A.M., et al., Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol*, 2012. **13**(12): p. 1187-95.
150. Dinarello, C.A., IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(1 Pt 1): p. 11-24.

151. Okamura, H., et al., Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
152. Bellora, F., et al., M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(6): p. 1618-26.
153. Nakanishi, K., et al., Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001. **12**(1): p. 53-72.
154. Nakanishi, K., Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 140-2.
155. Mailliard, R.B., et al., IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med*, 2005. **202**(7): p. 941-53.
156. Dinarello, C.A., et al., Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 289.
157. Yoshimoto, T., et al., IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*, 1998. **161**(7): p. 3400-7.
158. Kunikata, T., et al., Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol*, 1998. **189**(2): p. 135-43.
159. Kleinschek, M.A., et al., IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 1098-106.
160. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 2006. **27**(1): p. 17-23.
161. van de Vosse, E., et al., Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics*, 2003. **54**(12): p. 817-29.
162. Langrish, C.L., et al., IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 96-105.
163. Torti, D.C. and S.R. Feldman, Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis: current prospects. *J Am Acad Dermatol*, 2007. **57**(6): p. 1059-68.
164. Parham, C., et al., A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
165. Ghilardi, N., et al., Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2827-33.
166. Kikly, K., et al., The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(6): p. 670-5.
167. Tang, C., et al., Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*, 2012. **135**(2): p. 112-24.

168. Wagtmann, N., et al., Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 801-9.
169. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, Immune inhibitory receptors. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
170. Moretta, L. and A. Moretta, Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(5): p. 626-33.
171. Bottino, C., et al., Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*, 2005. **26**(4): p. 221-6.
172. Biassoni, R., et al., Human natural killer cell activating receptors. *Mol Immunol*, 2000. **37**(17): p. 1015-24.
173. Moretta, L., et al., Human NK-cell receptors. *Immunol Today*, 2000. **21**(9): p. 420-2.
174. Montaldo, E., et al., Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 2013. **83**(8): p. 702-13.
175. Siewiera, J., et al., Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 10183.
176. Poggi, A. and M.R. Zocchi, Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self-aggression. *Autoimmun Rev*, 2007. **6**(5): p. 295-9.
177. Meresse, B., et al., Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1343-55.
178. Hudspeth, K., B. Silva-Santos, and D. Mavilio, Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 69.
179. Horton, N.C. and P.A. Mathew, NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 31.
180. Pende, D., et al., Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
181. Augugliaro, R., et al., Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(5): p. 1235-41.
182. Delahaye, N.F., et al., Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med*, 2011. **17**(6): p. 700-7.
183. Pazina, T., et al., Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 369.
184. Gerosa, F., et al., Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 327-33.

185. Pogge von Strandmann, E., et al., Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, 2007. **27**(6): p. 965-74.
186. Vitale, M., et al., NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
187. Cantoni, C., et al., NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 787-96.
188. Hanna, J., et al., Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*, 2006. **12**(9): p. 1065-74.
189. Pessino, A., et al., Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, 1998. **188**(5): p. 953-60.
190. Walzer, T., et al., Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(9): p. 3384-3389.
191. Garg, A., et al., Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 6192-8.
192. Brusilovsky, M., et al., Carbohydrate-mediated modulation of NK cell receptor function: structural and functional influences of heparan sulfate moieties expressed on NK cell surface. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 185.
193. Narni-Mancinelli, E., et al., Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science*, 2012. **335**(6066): p. 344-8.
194. Chaushu, S., et al., Direct recognition of *Fusobacterium nucleatum* by the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(3): p. e1002601.
195. Braud, V.M., et al., HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
196. Ho, E.L., et al., Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6320-5.
197. Shum, B.P., et al., Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 240-52.
198. Raulet, D.H., Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 781-90.
199. Wu, J., et al., An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
200. Sutherland, C.L., et al., UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 671-9.

201. Bauer, S., et al., Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
202. Risti, M. and M.D. Bicalho, MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 179.
203. Stojanovic, A. and A. Cerwenka, Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun*, 2011. **3**(4): p. 355-64.
204. Cosman, D., et al., ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001. **14**(2): p. 123-33.
205. Ballard, D.W., Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth. *Immunol Res*, 2001. **23**(2-3): p. 157-66.
206. Karin, M. and F.R. Greten, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(10): p. 749-59.
207. Molinero, L.L., et al., Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol*, 2006. **67**(3): p. 170-82.
208. Raphael, I., et al., T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 5-17.
209. Murai, M., et al., Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*, 2009. **10**(11): p. 1178-84.
210. Woodsworth, D.J., M. Castellarin, and R.A. Holt, Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med*, 2013. **5**(10): p. 98.
211. Appleman, L.J. and V.A. Boussiotis, T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev*, 2003. **192**: p. 161-80.
212. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. *Lancet*, 1990. **335**(8697): p. 1078-80.
213. Kusaba, H., et al., Interleukin-12-induced interferon-gamma production by human peripheral blood T cells is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1037-43.
214. Martinovic, K.M., et al., Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*, 2015. **13**.
215. Alves, N.L., et al., IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8(+) T cells in vitro. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2541-2546.
216. Conway, R., et al., Interleukin 12 and interleukin 23 play key pathogenic roles in inflammatory and proliferative pathways in giant cell arteritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2018.
217. Sakane, T., et al., Current concepts - Behcet's disease. *New England Journal of Medicine*, 1999. **341**(17): p. 1284-1291.

218. Frassanito, M.A., et al., Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease - A putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis and Rheumatism*, 1999. **42**(9): p. 1967-1974.
219. Yasuoka, H., et al., In vivo activation of CD8+T cells and gamma-delta T cells in Behcet's disease. *Arthritis and Rheumatism*, 2004. **50**(9): p. S307-S307.
220. Hamzaoui, K., et al., Natural-Killer Cells in Behcets-Disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 1988. **71**(1): p. 126-131.
221. Correia, M.P., et al., IL-15 induces CD8+T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion. *Immunobiology*, 2011. **216**(5): p. 604-612.
222. Groh, V., et al., Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(16): p. 9452-9457.
223. Billadeau, D.D., et al., NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nature Immunology*, 2003. **4**(6): p. 557-564.
224. Guerra, N., et al., A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical Immunology*, 2013. **149**(3): p. 432-439.
225. Groh, V., et al., Fas ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity (vol 7, pg 755, 2006). *Nature Immunology*, 2006. **7**(9): p. 1004-1004.
226. Trimble, L.A., et al., CD3 zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood*, 2000. **96**(3): p. 1021-1029.
227. Brandt, C.S., et al., The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 2009. **206**(7): p. 1495-1503.
228. Matta, J., et al., Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood*, 2013. **122**(3): p. 394-404.
229. Thoren, F.B., et al., Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46-and Fas-Dependent Mechanism. *Journal of Immunology*, 2012. **188**(4): p. 1668-1674.
230. Sheppard, S., et al., The Murine Natural Cytotoxic Receptor NKp46/NCR1 Controls TRAIL Protein Expression in NK Cells and ILC1s. *Cell Reports*, 2018. **22**(13): p. 3385-3392.
231. Fujimori, K., et al., Circulating neutrophils in Behcet disease is resistant for apoptotic cell death in the remission phase of uveitis. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2008. **246**(2): p. 285-290.
232. Cebrian, M., et al., Triggering of T-Cell Proliferation through Aim, an Activation Inducer Molecule Expressed on Activated Human-Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1988. **168**(5): p. 1621-1637.

233. Sancho, D., et al., CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transform ing growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **112**(6): p. 872-882.
234. Gonzalez-Amaro, R., et al., Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends in Molecular Medicine*, 2013. **19**(10): p. 625-632.
235. Han, Y.M., et al., CD69(+)CD4(+)CD25(-) T Cells, a New Subset of Regulatory T Cells, Suppress T Cell Proliferation through Membrane-Bound TGF-beta 1. *Journal of Immunology*, 2009. **182**(1): p. 111-120.
236. Rodriguez-Munoz, A., et al., Levels of regulatory T cells CD69(+)NKG2D(+)IL-10(+) are increased in patients with autoimmune thyroid disorders. *Endocrine*, 2016. **51**(3): p. 478-489.
237. Hervier, B., et al., Phenotype and Function of Natural Killer Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 2011. **63**(6): p. 1698-1706.
238. Rus, V., et al., Increased expression and production of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) by T cells from lupus patients is a feature of active disease. *Clinical Immunology*, 2005. **115**: p. S120-S120.
239. Yamaguchi, Y., et al., Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease. *Arthritis Research & Therapy*, 2010. **12**(3).
240. Leong, J.W., et al., Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 Induces CD25 and a Functional High-Affinity IL-2 Receptor on Human Cytokine-Induced Memory-like Natural Killer Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2014. **20**(4): p. 463-473.
241. Lin, S.J., H.C. Chao, and M.L. Kuo, The effect of interleukin-12 and interleukin-15 on CD69 expression of T-lymphocytes and natural killer cells from umbilical cord blood. *Biology of the Neonate*, 2000. **78**(3): p. 181-185.
242. Houman, M.H. and N.B. Feki, Pathophysiology of Behcet's disease. *Revue De Medecine Interne*, 2014. **35**(2): p. 90-96.
243. Watford, W.T., et al., Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunological Reviews*, 2004. **202**: p. 139-156.
244. Vendrame, E., et al., Mass Cytometry Analytical Approaches Reveal Cytokine-Induced Changes in Natural Killer Cells. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*, 2017. **92**(1): p. 57-67.
245. Aktas, E., et al., Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular Immunology*, 2009. **254**(2): p. 149-154.
246. Hasan, M.S., et al., Circulating NK cells and their subsets in Behcet's disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017. **188**(2): p. 311-322.
247. Onder M, B.M., Gürer MA, Gülekon A, Sezgin P, Imir T, Natural cellular cytotoxicity in Behçet's disease. *J Dermatol*, 1994. **4**(Apr;21): p. 239-43.
248. Cosan, F., et al., Natural Killer Cell Subsets and Their Functional Activity in Behcet's Disease. *Immunological Investigations*, 2017. **46**(4): p. 419-432.

249. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.



HAM VERİLER

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1164

Tarih : 28.08.2013

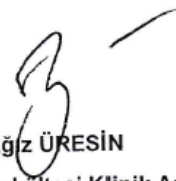
Konu : Prof. Dr. Günnur DENİZ

Sayın Prof. Dr. Günnur DENİZ
DETAE- İmmünoloji Anabilim Dalı

İlgi :DETAE- İmmünoloji Anabilim Dalının 05/08/2013 gün ve 166 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2013/1083 dosya numaralı "Behçet Hastalığında Aktive Edici Nk Reseptörleri" başlıklı çalışma kurulumuzun 16/08/2013 gün ve 14 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


 Prof.Dr. A. Yağz ÜRESİN
 İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
 Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

turnitin

BEHÇET HASTALIĞINDA AKTİVE EDİCİ DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) RESEPTÖRLER

< 1 / 1 > ?

7

F

Y

0

↓

0

DOKTORA

TEZİ HAZIRLAYAN ADI SOYADI
NİLGÜN SALLAKCI

DANIŞMAN UNVAN ADI SOYADI
PROF.DR.GÜNNUR DENİZ

Sayfa: 1 / 64 Kelime Sayısı: 17057

Test-only Report High Resolution 1200

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nilgün	Soyadı	Sallakcı
Doğ.Yeri	Üsküdar	Doğ.Tar.	01.08.1975
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	38185541308
Email	nilgunsal@yahoo.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2018
Yük.Lis.	Akdeniz Üniversitesi	2004
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2000
Lise	Yakacık Endüstri Meslek Lisesi	1992

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biolog	Akdeniz Üniversitesi	2005-2018
2.	Araştırmacı	German Research Centre For Biotechnology	2004-2005
3.	Arş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2001-2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	69	
Almanca	İyi	Orta	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

1. Dunder, N.O., et al., Interleukin-12 (-1188) A/C and interferon-gamma (+874) A/T gene polymorphisms in subacute sclerosing panencephalitis patients. J Neurovirol, 2016. 22(5): p. 661-665.
2. Akman, A., et al., TNF-alpha gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. Br J Dermatol, 2006. 155(2): p. 350-6.
3. Akman, A., et al., Relationship between periodontal findings and the TNF-alpha Gene 1031T/C polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2008. 22(8): p. 950-7.
4. Bacanlı, A., et al., Toll-like receptor 2 Arg753Gln gene polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. Clin Exp Dermatol, 2006. 31(5): p. 699-701.
5. Coskun, M., et al., Specific interleukin-1 gene polymorphisms in Turkish patients with Behcet's disease. Exp Dermatol, 2005. 14(2): p. 124-9.
6. Koc, C.K., et al., Human leukocyte antigens class I and class II in patients with pemphigus in southern Turkey. Int J Dermatol, 2013. 52(1): p. 53-8.
7. Mihci, E., et al., VEGF polymorphisms and serum VEGF levels in Parkinson's disease. Neurosci Lett, 2011. 494(1): p. 1-5.
8. Nur, B.G., et al., Interleukin-6 gene polymorphism in febrile seizures. Pediatr Neurol, 2012. 46(1): p. 36-8.

9. Ruhi, C., et al., The influence of CTLA-4 single nucleotide polymorphisms on acute kidney allograft rejection in Turkish patients. *Clin Transplant*, 2015. 29(7): p. 612-8.
10. Sallakci, N., et al., TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. *J Autoimmun*, 2005. 25(2): p. 150-4.
11. Sallakci, N., et al., CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. *Clin Exp Dermatol*, 2005. 30(5): p. 546-50.
12. Sallakci, N., et al., Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007. 87(3): p. 225-30.
13. Ulker, M., et al., CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet*, 2009. 36(4): p. 245-50.
14. Ali Bacanlı, Ayşe Akman Karakaş, Nilgün Sallakçı, Sühan Günaştı Topal, Soner Uzun, Erkan Alpsoy. CTLA-4 +49 A/G, -318 C/T, -1661 A/G, CT60 A/G Gene Polymorphisms in Patients with Pemphigus in Turkey. *Turk J Dermatol* 2017;11:75-9.
15. Esmâ KONUK, Nilgün SALLAKCI, Olcay YEĞİN. Interferon Gamma (IFN- γ) Promoter and P2X7 Polymorphisms in Turkish Tuberculosis Patients. *ATD* 2016; 2: 133-141.
16. Dilara Fatma Kocacık Uygun, Mesut Coşkun, Nilüfer Çiçek Ekinci, Nilgün Sallakçı, Serkan Filiz, Ayşe Akman, Erkan Alpsoy, Olcay Yeğîn. The Role of Chitinases in Atopic Dermatitis. *Turk J Immunol* 2013;1(2):33-35
17. Dilara Fatma KOCACIK UYGUN, Münevver ÖZBAY, Nilgün SALLAKCI, Yahya KILINÇ, Serkan FİLİZ, Olcay YEGİN. Human Leukocyte Antigen Frequencies in Highly Sensitized Patients. *Turk J Immunol* 2015;3(1)11-14.

