

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

Proje Başlığı

Behçet Hastalarında PDCD1 gen polimorfizmlerinin incelenmesi

Proje Yöneticisi.

Yrd. Doç. Dr. Türker DUMAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı

Proje Başlangıç Tarihi

Haziran 2009

Proje Bitiş Tarihi

Şubat 2010

Kesin Rapor Tarihi

9 Temmuz 2010

Proje No

09H3330001

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri
Ankara “2010”**

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Projenin Adı

Behçet Hastalarında PDCD1 gen polimorfizmlerinin incelenmesi

Özet

Behçet hastalığı kronik, multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır. Bazı hastalarda aile öyküsü bulunması, major histokompatibilite kompleksi (MHC) antijeni olan HLA-B51 pozitifliğinin hastaların yarısından çoğunda bulunması hastalığın genetik yanını ortaya koymaktadır. Behçet in patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, T hücrelerinin Behçet hastalığında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hastalıkta T hücrelerinin multiple antijenlere karşı yüksek duyarlılıkta olduğu kabul edilir ve antijen özgül T hücre cevaplarının semptom ataklarını uyardığı düşünülür. Behçet hastalığının başlaması ve aktivasyonun tetiklenmesinde antijen sunumunun da rol oynadığı düşünülmektedir.

Programmed cell death-1 (PDCD 1) aktif T hücreleri, B hücreleri ve miyeloid hücrelerde eksprese olan immünoinhibitör bir reseptördür. PDCD1 ve ligandlarıyla etkileşimi T-hücre receptör aracılı lenfosit proliferasyonunu ve sitokin salınımını inhibe ederken, CD28 aracılı kostimülasyonu da inhibe etmektedir. PDCD1 eksikliği olan farelerde çeşitli otoimmün hastalıkların geliştiği görülmüştür. PDCD-1 gen bölgesi yapılan genom boyu bağlantı analizi çalışmalarında bazı otoimmün hastalıklar için aday bir loküs olarak belirlenmiştir. PDCD 1 genindeki polimorfizmlerin SLE, rheumatoid artrit, tip 1 diabet gibi otoimmün hastalıklarda ilişkilendirilmiş olması, ko-sitümülasyonda rol oynayan moleküllerin antijen sunumunda da etkili olabilmesi, PDCD-1 genindeki değişikliklerin Behçet hastalığında çalışılmasının anlamlı olacağını düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı Behçet hastalarında daha önce çalışılmamış olan PDCD-1 genindeki polimorfizmlerin araştırılmasıdır. Çalışmaya 166 Behçet ve 182 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. PDCD1 genindeki -536 G/A, 6438 G/A, 7146 G/A, 7209 C/T, 7625 C/T (215Ala/ Val), 7785 C/T (268Ala/Ala) polimorfizmleri PCR/RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, -536 G/A ve bağlantılı olduğu 6438 G/A, 7146 G/A ve 7625 C/T polimorfizmleri hastalar ve kontrollerde anlamlı bir farklılık göstermemişlerdir ($p>0.05$). 7209 T aleli Behçet hastalarında istatistiksel olarak sınırdaki da olsa yüksek bulunmuştur (hastalarda %12, kontrollerde %7 OR :1.68 $P=0.052$). 7785 T/T genotipi hastalarda anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (BH %12 kontroller %3 OR: 3.76, $p=0.006$). Sınırdaki anlamlılık gösteren 7209 C/T ve genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg den sapma gösterdiğini gördüğümüz 7785 C/T polimorfizmlerinin daha geniş hasta gruplarında ileri çalışmalarla doğrulanmasıyla, PDCD-1 genindeki bu polimorfizmlerin Behçet hastalığıyla ilişkilendirilebilmesi mümkün olacaktır. .

Title

Analysis of PDCD1 gene polymorphisms in Behçet's Disease

Summary

Behcet's disease (BD) is a chronic multisystemic inflammatory disorder. Family history of the disease and association of MHC antigene HLA B51 in more than half of the patients implies the genetic background of the disease. Although the pathogenesis is not yet fully known, it is believed that T cells plays a major role in Behçet's pathogenesis. In BD, T cells are highly

sensitive to multiple antigens and it is believed that antigene specific T cell response induce symptom attacks. It is also believed that antigene presentation plays an important role in triggering initiation and activation of Behçet Disease.

Programmed cell death-1 (PDCD 1) is an immunoinhibitory receptor which is expressed in active T cells, B cells and myeloid cells. PDCD1 and interaction with its ligands results in inhibition of T cell mediated lymphocyte proliferation and cytokine segregation and also CD 28 mediated co-stimulation. In mouse, lack of PDCD 1 results in autoimmune diseases. The location of the gene was found as a candidate locus for some autoimmune diseases in genome wide linkage studies. Some polymorphisms in PDCD 1 gene were found to be associated with a number of autoimmune disease including SLE, RA and we think that PDCD-1 gene might be associated with BD also

The aim of this study is to investigate PDCD-1 gene polymorphisms in Behçet's disease. 166 BD patients and 182 healthy controls were included in the study. PDCD1 gene -536 G/A, 6438 G/A, 7146 G/A, 7209 C/T, 7625 C/T (215Ala/ Val), 7785 C/T (268Ala/Ala) polymorphisms were detected by using PCR/RFLP method.

When we evaluate the results we found that, -536 G/A, 6438 G/A (in linkage disequilibrium with - 536), 7146 G/A and 7625 C/T polymorphisms did not differ in patients and controls significantly ($p>0.05$). 7209 T allele was higher in BD patients but it was just at the limit of statistical significance (BD 12%, controls 7% OR :1,68 $P=0,052$). 7785 T/T genotype was found significantly higher in patients (BD 12%, controls 3% OR:3,76, $p=0,006$). Further studies concerning 7209 C/T (which was statistically at the limit) and 7785 C/T (genotype distributions deviate from Hardy-Weinberg equilibrium) polymorphisms in large sample sizes are needed to uncover whether these polymorphisms result in susceptibility to BD

II. Amaç ve Kapsam

Behçet hastalığı kronik, multisistemik ve etiolojisi bilinmeyen inflamatuvar bir hastalık olup oral- genital ülserler ve üveit ile karakterizedir. Gastrointestinal, pulmoner, vasküler ve nörolojik sisteme ait bulgular da görülebilir. Hastalık erişkinlerde görüldüğü gibi çocuklarda da gelişebilir. Bazı hastalarda aile öyküsü bulunmaktadır. Genetik özellik olarak ırklar arasında farklı oranlar verilmekle birlikte major histokompatibilite kompleksi (MHC) içeriğinde bir antijen olan HLA-B51 pozitifliği hastaların yarısından çoğunda bulunmaktadır (Ohne 1982). T hücreleri Behçet hastalığının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Behçet hastalığında T hücrelerinin multiple antijenlere karşı yüksek duyarlılıkta olduğu kabul edilir ve antijen özgül T hücre cevaplarının semptom ataklarını uyardığı düşünülür. T hücrelerinin tam aktivasyonu için 2 sinyal gerektiği bilinmektedir. Birinci sinyal antijene özgüdür ve T hücre reseptörü tarafından, antijenin MHC kompleksine bağlanmasının tanınmasıyla oluşur. İkinci sinyal yardımcı uyarıcıdır ve antijen sunan hücrelerdeki CD80 ya da CD86 molekülerinden birinin T hücrelerdeki CD28 ile etkileşimi sonucunda oluşur. Behçet hastalığı her ne kadar Mendel tipi kalıtım göstermese de hastalarda bir aile öyküsünün olması ve hastalığın MHC genleriyle birlikteliği Behçet'in genetik yanını ortaya koymaktadır. Behçet hastalığına yatkınlık yaptığı ya da yapabileceği düşünülen genler ve bu genlerdeki polimorfizmler sıklıkla araştırılmaktadır.

PDCD 1 aktive T hücreleri, B hücreleri ve myeloid hücrelerde eksprese olan immüninhibitör bir reseptördür (Freeman 2000). İmmunoglobulin super ailesine (CD28) dahildir ve amino asit dizisi CTLA4 geniyle %28 homoloji göstermektedir (Freeman 2000). PDCD1 ligandlarıyla etkileşimi sırasında T hücrelerine negatif sinyaller iletir ve hücrenin G0/G1 dinlenme fazında kalmasını sağlar (Latchman 2001). PDCD1 ve ligandlarıyla etkileşimi T-hücre reseptör aracılı lenfosit proliferasyonunu ve sitokin salınımını inhibe ederken, CD28

aracılı kostimülasyonu da inhibe etmektedir. PDCD1 eksikliği olan farelerde periferal toleransın bozulduğu ve otoimmün hastalık geliştiği görülmüştür . C57BL/6 farelerinde PDCD1 geninin tahribi geç başlangıçlı SLE ye yol açmaktadır (Nishimura 1999). PDCD1 geninde defekt olan NOD faresinde ise tip bir diabet gelişmektedir (Wang 2005, Ansari 2003). Yine fare çalışmalarında bu gendeki bozukluğun kalp dokusuna karşı oto antikörlerle birlikte erken yaşta başlayan otoimmün dilate kardiyomyopati gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Nishimura 2001, Okazaki 2003).

PDCD 1 geni 2q27 de lokalizedir, bu bölge yapılan genom boyu bağlantı analizi çalışmalarında SLE için aday bir loküs olarak bulunmuştur . (Lindqvist 2000, Magnusson 2000). 5 ekzondan oluşmuştur ve 288 amino asitlik bir protein kodlar.

PDCD1 genindeki bazı polimorfizmlerin PDCD1 geninin fonksiyonunu bozduğu düşünülmektedir. İntron 4 teki bir polimorfizmin transkripsiyon faktörü RUNX1 in bağlanmasını etkilediği ve PDCD1 ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir (Prokunina 2002). Yapılan çalışmalarda PDCD 1 genindeki polimorfizmlerin SLE, rheumatoid artrit, tip 1 diabet, gibi otoimmün hastalıklarda ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ferreiros-Vidal 2004, Wang 2006, Johansson 2005, Prokunina 2004, Kong 2005, Lin 2004, Nielsen 2003, Kroner 2005).

Behçet hastalığının başlaması ve aktivasyonun tetiklenmesinde antijen sunumunun da rol oynadığı düşünülmektedir (Evereklioglu 2005). Ko-sitümülasyonda rol oynayan moleküllerin antijen sunumunda da etkili olabilmesi, PDCD-1 genindeki değişikliklerin Behçet hastalığında çalışılmasının anlamlı olacağını düşündürmektedir. Behçet hastalığının oluşum mekanizmasında rolü olabileceği düşünülen PDCD1 genindeki polimorfizmlerin araştırılması ve varsa Behçet in kliniğiyle korelasyonunun saptanması hem hastalığın etyopatogenezinin açıklanması hem de gerektiğinde yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi konusunda mevcut bilgilere katkı sağlayacaktır. Bugüne kadar Behçet hastalarında PDCD1 gen polimorfizmleri üzerine yapılan bir çalışma yoktur. Bu çalışmada yaklaşık 166 Behçet ve 182 sağlıklı kontrolde, PCR-RFLP tekniği kullanılarak 6 farklı polimorfizmin incelenmesi planlanmıştır. Bu polimorfizmlerin hastalar ve sağlıklı kontrollerde taranmasıyla PDCD-1 geninin Behçet hastalığının gelişiminde bir risk faktörü olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

III. Materyal ve Yöntem

Çalışma popülasyonu :

Proje kapsamında incelenecek olan hastalar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesine başvuranlar arasından seçilmiştir. Yaşları 21-65 arasında değişen 166 kişi (86 erkek, 80 kadın) Behçet hastası olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların hepsi , Uluslararası Çalışma Grubunun Behçet hastalığı tanısı için oluşturduğu kriterlere uygun olarak Behçet Hastalığı tanısını almışlardır (International Study Group Diagnostic Criteria for Behçet's Disease). Kontrol grubu örnekleri ise kendisinde ve ailesinde hastalık bulunmayan, gönüllü olarak çalışmaya katılmak isteyen 88 kadın ve 94 erkek olmak üzere 182 kişiden oluşmuştur.

Moleküler Analizler:

Hasta ve kontrollerden periferik kan örnekleri alınarak DNA izole edilmiştir. Toplu halde kısa sürede izolasyon sağlanabilmesi amacıyla Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Mutasyon Analizi:

DNA örneği alınmış kişilerde PDCD 1 genindeki -536 G/A (promoter), 6438 G/A (intron 2), 7146 G/A (intron 4), 7209 C/T (intron 4), 7625 C/T (ekzon 5, amino asid 215, Ala→ Val), 7785 C/T (ekzon5, amino acid 268, Ala→ Ala, sinonim) polimorfizmleri belirlemek için PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri aşağıda verilmiştir (Wang 2006).

| | Primer | Restriction Endonükleaz |
|----------|---|-------------------------|
| -536 G/A | 5 ₋ -CCGATTAGCCATGGACAG-3 ₋ 5 ₋ -TTCCTGGGCTGCAGTGAG-3 ₋ | Nci I |
| 5708 C/T | 5 ₋ -CCAGAGCAGTGCAGACAG-3 ₋ 5 ₋ -TCATTGAGAAGTCTCTGCTG-3 ₋ | Hha I |
| 6438 G/A | 5 ₋ -TGCACAGGATCAGGAGCTC-3 ₋ 5 ₋ -CCCAGACTAGCAGCACCAG-3 ₋ | Msp I |
| 7146 G/A | 5 ₋ -ACGGCCTGCAGGACTCAC-3 ₋ 5 ₋ -AGGCAGGCACATATGTG-3 ₋ | Bsa I |
| 7209 C/T | 5 ₋ -ACGGCCTGCAGGACTCAC-3 ₋ 5 ₋ -AGGCAGGCACATATGTG-3 ₋ | BstU I |
| 7625 C/T | 5 ₋ -GATCACACAGAGGGCAGTG-3 ₋ 5 ₋ -CACAGAGAACACAGGCCCG-3 ₋ | Msp I |
| 7785 C/T | 5 ₋ -CGGAGTATGCCACCATTGTC-3 ₋ 5 ₋ -GGTCTGCAGAACACTGGTG-3 ₋ | Alu I |

İncelenecek olan polimorfizmleri belirlemek için yukarıda listelenen primerlerle PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda, -536G/A için 188 bç'lik bölge, 6438 G/A için 326 bç'lik bölge, 7146 G/A ve 7209 C/T için 225 bç'lik tek bir bölge, 7625 C/T için 191 bç'lik ve 7785 C/T için 165 bç'lik bölge çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler yukarıda listelenen restriksiyon enzimleri ile 37°C 'de gece boyunca bekletilerek %3 lük agaroz jel elektroforeziyle incelendi. Agaroz jelde 30 dakikalık elektroforez sonrasında ethidium bromide ile boyanan örnekler fotoğraflanarak bilgisayar ortamında saklandı.

İstatiksel analiz:

Verileri analiz etmek için Binary logistic regression modeli kullanılmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında (%95CI) Odds ratios (OR) olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak belirlenmiştir. Gözlenen ve Hardy-Weinberg equilibrium tarafından öngörülen genotipler arasındaki uygunluk için, likelihood ratio (G statistic) kullanıldı. Analizler MINITAB® Release 15 Statistical Software for Windows programme and Popgene (version 1.32) software programları kullanılarak yürütüldü.

IV. Analiz ve Bulgular

PDCD 1 genindeki incelenen polimorfimlerin hasta ve kontrol gruplarına ait genotip sıklıkları Tablo 1, alel sıklıkları ise Tablo 2’ de gösterilmiştir.

Tablo 1: Behçet hastaları ve kontrol grubunda PDCD-1 genotiplerinin dağılımı

| PDCD-1 polymorphismleri | Behçet Hastaları | | Kontroller | | P | OR | %95 CI |
|----------------------------|------------------|----|------------|----|--------------|-------------|------------|
| | N | % | N | % | | | |
| - 536 G/G | 138 | 92 | 133 | 91 | 0,780 | 1,12 | 0,50-2,55 |
| A/G | 12 | 8 | 13 | 9 | 0,780 | 0,89 | 0,39-2,02 |
| A/A | - | - | - | - | | | |
| 6348 G/G | 138 | 92 | 133 | 91 | 0,780 | 1,12 | 0,50-2,55 |
| A/G | 12 | 8 | 13 | 9 | 0,780 | 0,89 | 0,39-2,02 |
| A/A | - | - | - | - | | | |
| 7146 G/G | 135 | 81 | 143 | 79 | 0,680 | 1,12 | 0,66-1,88 |
| A/G | 25 | 15 | 37 | 20 | 0,201 | 0,69 | 0,40-1,21 |
| A/A | 6 | 4 | 2 | 1 | 0,110 | 3,37 | 0,67-16,96 |
| 7209 C/C | 130 | 78 | 145 | 85 | 0,099 | 0,62 | 0,35-1,09 |
| C/T | 33 | 20 | 25 | 15 | 0,129 | 1,56 | 0,87-2,80 |
| T/T | 3 | 2 | - | - | | | |
| 7625 C/C | 146 | 91 | 136 | 92 | 0,685 | 0,84 | 0,37-1,92 |
| C/T | 14 | 9 | 11 | 8 | 0,685 | 1,19 | 0,52-2,70 |
| T/T | - | - | - | - | | | |
| 7785 CC | 74 | 50 | 67 | 45 | 0,357 | 1,24 | 0,79-1,95 |
| C/T | 57 | 38 | 78 | 52 | 0,020 | 0,58 | 0,36-0,92 |
| TT | 17 | 12 | 5 | 3 | 0,006 | 3,76 | 1,35-10,49 |

PD-1 geninin promotör bölgesinde yer alan -536 G/A ve onunla linkage disequilibrium içerisinde olduğu anlaşılan 2. ekzondaki 6438 G/A genotipleri hastalar ve kontrollerde farklı bir dağılım göstermemişlerdir (Tablo 1). Genin 4. ekzonunda bulunan 7146 G/A polimorfizmi incelendiğinde AA genotipinin Behçet hastalarında kontrollere oranla yüksek bulunduğu (%4, %1) görülmüşse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamıştır (OR: 3.37 p=0.110). 5. ekzonda bulunan ve 215. kodonda alanin-valin amino asit değişikliğine neden olan 7625 C/T polimorfizmi hastalar ve kontrollerde yaklaşık olarak aynı oranlarda bulunmuş ve anlamlı bir farklılık göstermemiştir (p>0.05). 7209 C/T polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, hastalarda kontrollerle kıyaslandığında yüksek oranda bulunmuştur (OR:1.56 p=0.129), kontrollerde TT genotipinde bireye rastlanmamış bu yüzden istatistiksel bir değer elde edilememiştir. 7209 C/T polimorfizminin alel sıklıklarına baktığımızda, 7209 pozisyonunda T alelinin taşımanın Behçet hastaları için yaklaşık 1.7 kat risk artışı getirdiği görülmüş, istatistiksel olarak sınırdaki bir anlamlılık gösterdiği bulunmuştur (OR:1.68, p=0.05) (Tablo 2). 7785 C/T polimorfizmi incelendiğinde 7785 T/T genotipi hastalarda %12 kontrollerde ise %3 oranında görülmüş ve anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (OR:3.76 p=0.006). Alel sıklıklarına baktığımızda ise 7785 C/T polimorfizmi anlamlı bir farklılık göstermemektedir (Tablo2). Bu polimorfizm Hardy

Weinberg equilibriumundan sapan bir genotip dağılımı göstermektedir ve daha geniş hasta gruplarında doğrulanmaya ihtiyacı vardır.

Tablo 2: Behçet hastaları ve kontrollerde PDCD 1 genindeki alel sıklıkları

| PDCD-1 geni aleller | Behçet Hastaları | | Kontroller | | P | OR | %95 CI |
|------------------------|------------------|----|------------|----|--------------|-------------|-------------|
| | 2n | % | N | % | | | |
| - 536 G | 288 | 96 | 279 | 95 | 0,785 | 1,12 | 0,50 – 2,49 |
| A | 12 | 4 | 13 | 5 | 0,785 | 0,89 | 0,40 -1,99 |
| 6348 G | 288 | 96 | 279 | 95 | 0,785 | 1,12 | 0,50 – 2,49 |
| A | 12 | 4 | 13 | 5 | 0,785 | 0,89 | 0,40 -1,99 |
| 7146 G | 295 | 89 | 323 | 89 | 0,960 | 1,01 | 0,63 -1,62 |
| A | 37 | 11 | 41 | 11 | 0,960 | 0,99 | 0,62 -1,58 |
| 7209 C | 293 | 88 | 315 | 93 | 0,052 | 0,60 | 0,35 -1,01 |
| T | 39 | 12 | 25 | 7 | 0,052 | 1,68 | 0,99 -2,84 |
| 7625 C | 306 | 96 | 283 | 96 | 0,692 | 0,85 | 0,38 -1,90 |
| T | 14 | 4 | 11 | 4 | 0,692 | 1,18 | 0,53 -2,64 |
| 7785 C | 205 | 50 | 212 | 71 | 0,707 | 0,94 | 0,66 -1,33 |
| T | 91 | 38 | 88 | 29 | 0,707 | 1,07 | 0,75 -1,52 |

V. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada SLE, rheumatoid artrit, tip 1 diabet, gibi birçok otoimmün hastalıkta anlamlı olduğu gösterilmiş PDCD1 genindeki 6 polimorfizm Behçet hastalarında incelenmiştir. Hastalar kontrollerle kıyaslandığında -536G/A, 6348 G/A, 7146 G/A ve 7625 C/T polimorfizmlerinin gruplar arasında anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir. 7785 C/T polimorfizmini ise bu çalışmada Behçet hastalığıyla ilişkili bulunmuştur. 5. ekzon 7785 pozisyonunda TT genotipini taşımayı Behçet hastalarında anlamlı bir şekilde yüksek bulmamıza rağmen bu polimorfizmin Hardy Weinberg equilibriumuna uygun dağılım göstermemektedir dolayısıyla, bu sonucun daha geniş hasta gruplarında incelenerek doğrulanmasına ihtiyaç vardır. 7209 T alelini Behçet hastalarında yüksek sıklıkta saptadık fakat istatistiksel olarak sınırda bir anlamlılık olmasından dolayı da bu polimorfizminin daha geniş hasta gruplarında incelenmesinin anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz.

VI. Kaynaklar

- Evereklioglu, C. (2005) Current concepts in the etiology and treatment of Behçet's disease. *Survey of Ophthalmology*, **50**, 297.
- Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F *et al.*: Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: Evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 50(8):2590–2597, 2004
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y *et al.*: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negativeregulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192(7):1027–1034, 2000
- Johansson M, Arlestig L, Moller B, Rantapaa-Dahlqvist S: Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52(6):1665–1669,2005
- Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH *et al.*: A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 52(4):1058–1062, 2005
- Kroner A, Mehling M, Hemmer B *et al.*: A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58(1):50–57, 2005
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T *et al.*: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2(3):261–268,2001
- Lin SC, Yen JH, Tsai JJ *et al.*: Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50(3):770–775, 2004
- Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B *et al.*: A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 14(2):169–178, 2000
- Magnusson V, Lindqvist AK, Castillejo-Lopez C *et al.*: Fine mapping of the SLEB2 locus involved in susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Genomics* 70(3):307–314, 2000
- Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST: Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62(6):492–497,2003
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T: Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11(2):141–151, 1999
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y *et al.*: Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291(5502):319–322, 2001
- Ohno, S., Ohguchi, M., Hirose, S., Matsuda, H., Wakisaka, A. & Aizawa, M. (1982) Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Archives of Ophthalmology*, **100**, 1455
- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R *et al.*: Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9(12):1477–1483, 2003
- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F *et al.*: A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *NatGenet* 32(4):666–669, 2002
- Prokunina L, Padyukov L, Bennet A *et al.*: Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 50(6):1770–1773, 2004

- Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T: Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 102(33):11823–11828, 2005
- Wang SC, Chen YJ, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Liu HW, Yen JH. Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. J Clin Immunol. 2006 Nov;26(6):506-11
- Wang SC, Chen YJ, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Liu HW, Yen JH. Programmed death-1 Gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bu çalışma için 09H3330001 nolu BAP projesi kapsamında alımı gerçekleşen sarf malzeme kullanılmıştır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Proje kapsamında herhangi bir demirbaş alımı yapılmamıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

-536 G/A polimorfizmini belirlemek için yapılan PCR/RFLP analizi,

PCR koşulları 1x taq tamponu, 0.2 mM dNTP, 1UM primer, 1.25 mM MgCL₂ ve yaklaşık 0.4 µg DNA konularak 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR için kullanılan program 96°C 3 dk denaturasyon sonrasında 95°C de 1 dk, 60°C de 1 dk, 72°C de 1 dk olmak üzere 5 siklus ve 95°C de 1 dk 58°C de 1 dk 72 °C de 1 dk olarakta 30 siklus gerçekleştirmiş ve 72°C 7 dk'lık son bir uzama yapılmıştır. G/A nükleotid değişikliğini belirlemek için 10 µl PCR ürünü 10 ünite *NciI* enzimiyle toplam hacim 20 µl olacak şekilde kesilmiştir.

6438 G/A polimorfizmini tayin etmek için yapılan PCR/RFLP analizi

PCR koşulları 1x taq tamponu, 0.2 mM dNTP, 1UM primer, 1.25 mM MgCL₂ ve yaklaşık 0.4 µg DNA konularak 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR için kullanılan program 96 3 dk denaturasyon sonrasında 95°C de 1 dk, 63°C de 1 dk, 72°C de 1 dk olmak üzere 30 siklus gerçekleştirmiş ve 7 dk 72°C de olmak üzere son bir uzama yapılmıştır. G/A nükleotid değişikliğini belirlemek için 10 µl PCR ürünü 10 ünite *MspI* enzimiyle toplam hacim 20 µl olacak şekilde kesilmiştir.

7146 ve 7209 polimorfizmlerini tayin etmek için

PCR koşulları 1x taq tamponu, 0.2 mM dNTP, 1UM primer, 1.25 mM MgCL₂ ve yaklaşık 0.4 µg DNA konularak 50 µl son hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR için kullanılan program 96°C 3 dk denaturasyon sonrasında 95°C de 1 dk 56°C de 1 dk 72°C de 1 dk olarakta 30 siklus gerçekleştirmiş ve 72°C 7 dk son bir uzama yapılmıştır. 7146 G/A nükleotid değişikliğini belirlemek için 10 µl PCR ürünü 10 ünite *BsaI* enzimiyle toplam hacim 20 µl olacak şekilde, 7209 C/T polimorfizmi ise 8

ünite *Bst*UI enzimiyle kesilmiştir

7625 C/T polimorfizmini tayin etmek için yapılan PCR/RFLP analizi,

PCR koşulları 1X Taq tamponu, 0.2 mM dNTP, 1UM primer, 1.50 mM MgCL₂ ve yaklaşık 0.4 µg DNA konularak 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR için kullanılan program 96°C 3 dk başlangıç denaturasyonu sonrasında, 95°C de 1 dk 58°C de 1 dk 72°C de 1 dk 30 siklus olarak gerçekleştirilmiş ve 7 dk 72°C de son bir uzama yapılmıştır. A/G değişikliğini belirlemek için 10 µl PCR ürünü 10 ünite *Msp*I enzimiyle toplam hacim 20 µl olacak şekilde kesilmiştir.

7785 C/T polimorfizmini belirlemek için yapılan PCR/RFLP analizi

PCR koşulları 1X Taq tamponu, 0.2 mM dNTP, 1UM primer, 1.25 mM MgCL₂ ve yaklaşık 0.4 µg DNA konularak 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR için kullanılan program 96°C 3 dk denaturasyon sonrasında 95°C de 1 dk, 62°C de 1 dk, 72°C de 1 dk olmak üzere 30 siklus olarak gerçekleştirilmiş ve 7 dk 72°C de son uzama yapılmıştır. C/T değişikliğini belirlemek için 8 µl PCR ürünü 8 ünite *Alu*I enzimiyle toplam hacim 20 µl olacak şekilde kesilmiştir.

d) Sunumlar

Poster sunumu olarak gönderilmiştir

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

Yayına hazırlanmaktadır.