ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

BEHÇET SENDROMU'NDA KARŞILAŞTIRMALI GENOM BOYU İFADE ANALİZİ

Ali Kemal Oğuz

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. M. Nejat Akar

Eylül

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; bilimsel araştırma metodolojisine uygun olarak yürütüldüğünü, akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu ve tez çalışmasına ait herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığını beyan ederim.

Ali Kemal Oğuz

İmza

ONAY

Prof. Dr. M. Nejat Akar danışmanlığında Ali Kemal Oğuz tarafından hazırlanan bu çalışma 14/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:	Prof. Dr. Nejat AKAR	İmza:
Üye:	Prof. Dr. Aysel GÜRLER	İmza:
Üye:	Prof. Dr. Aşkın ATEŞ	İmza:
Üye:	Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	İmza:
Üye:	Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU	İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Behçet Sendromu'nda Karşılaştırmalı Genom Boyu İfade Analizi

Ali Kemal Oğuz

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. M. Nejat Akar

Behçet sendromu (BS) kronik, multisistemik enflamatuvar bir sorundur ve Türkiye'yi de içerecek şekilde "İpek Yolu" boyunca sık belirlenmektedir. Önemli morbiditeleri ve yüksek mortalite hızı ile birlikte, BS'nin patogenezi, sınıflandırması ve rasyonel tedavi yaklaşımı ile ilgili halen cevaplanmamış sorular mevcuttur. Behçet sendromu'nun moleküler hastalık mekanizmalarını aydınlatmak ve muhtemel tedavi hedeflerini tanımlamak üzere, Türk BS olgularında mikrodizin temelli bir karşılaştırmalı genom boyu ifade analizi gerçekleştirdik. Bu amaçla, 29 BS olgusu (B) ve 15 yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol bireyi (C) toplandı. Behçet sendromu olguları klinik özelliklerine göre mukokütan (M, n=8), oküler (O, n=5), vasküler (V, n=9) ve diğer (D, n=7) olarak gruplandırıldılar. GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 mikrodizinleri kullanılarak, BS olguları ile kontrollerin periferik kan örneklerinde gen ifadesi profillemesi gerçekleştirildi. Farklı ifadeye sahip gen (DEG) setlerinin ortaya konmasından sonra, gen ifade verisi, analiz/görüntüleme ve biyoinformatik zenginleşme analizi araçları kullanılarak ileri analizlere tabi tutuldular. Mikrodizin verisine ait geçerli kılma deneyleri, seçilmiş genler üzerinde kantitatif eş zamanlı PCR kullanılarak gerçekleştirildi. Sınıf karşılaştırması analizleri, *p* ve kat değişimi (FC) değerlerinin sırasıyla ≤0,05 ve ≥2,0 seçilmesiyle, şu DEG sayılarını verdiler; B x C: 28, M x C: 20, O x C: 8, V x C: 555, M x O: 6, M x V: 324, O x V: 142. Venn şeması analizi M x C ∩ O x C ∩ V x C kesişim kümesinde sadece iki geni, yani *CLEC12A* ve *IFI27*'yi ortaya koydu. Farklı ifadeye sahip gen setlerinde dikkat çeken diğer bir gen *CLC* olarak belirlendi. Kümeleme analizleri, farklı BS hastalık fenotiplerini başarıyla kümeledi. Gen ontolojisi terimleri zenginleşme analizleri, M grubunda doğal bağışıklık yanıtı ile ilgili biyolojik süreçleri gösterirken, O ve V gruplarında adaptif bağışıklık yanıtları belirgin olarak zenginleşme gösterdiler. Farklı hastalık fenotiplerine sahip BS olguları bir arada incelendiklerinde, özellikle moleküler düzeyde önemli bilgi kaybı oluşmaktadır. Behçet sendromu olgularının farklı hastalık fenotipleri farklı gen ifade profilleri sergilemektedir ve bu durum, M x V ve O x V karşılaştırmalarında çarpıcı olarak belirgin hale gelmektedir. Türk BS olgularında *CLEC12A, IFI27* ve *CLC* genlerini ilgilendiren ifade değişiklikleri, hastalık patogenezinde rol oynuyor olarak görülmektedir. Genellikle BS hastalık yelpazesinin "hafif" ucunda yer aldığı düşünülen mukokütan BS, doğal bağışıklık yanıtı süreçlerinde zenginleşme göstermektedir. Bunun zıttı olarak, hastalık yelpazesinin "ağır" ucunda yerleşmiş olan oküler ve vasküler BS fenotipleri ise, adaptif bağışıklık yanıtı başlıklarına ait zenginleşme sergilemektedir. Bu bulgulara dayanarak, gelecek araştırmalar BS hastalık fenotiplerinin immünogenetik heterojenitesini dikkate almalıdır. İki antienflamatuvar gen, yani *CLEC12A* ve *CLC*, BS durumunda tedavi hedefi olarak değer taşıyabilir ve deney modeli geliştirilmesine yardımcı olabilir.

2021, 124 sayfa

Anahtar kelimeler: Behçet sendromu, doğal bağışıklık, adaptif bağışıklık, gen ifadesi, *CLEC12A, CLC, IFI27,* mikrodizin

ABSTRACT

PhD Thesis

Comparative Whole Genome Transcriptome Analysis in Behçet's Syndrome

Ali Kemal Oğuz

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. M. Nejat Akar

Behçet's syndrome (BS) is a chronic, multisystemic inflammatory condition prevalant across the "Silk Road" including Turkey. With its important morbidities and high mortality rates, BS has still unanswered questions regarding its pathogenesis, classification, and rational therapeutics. In order to elucidate the molecular disease mechanisms of BS and identify potential therapeutic targets, we performed a microarray based comparative genome-wide expression analysis in Turkish BS patients. For this purpose, 29 BS patients (B) and 15 age and sex matched control subjects (C) were recruited. Patients with BS were grouped according to their disease manifestations as mucocutaneous (M, n=8), ocular (O, n=5), vascular (V, n=9), and other (D, n=7). By using GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays, gene expression profiling was performed on peripheral blood samples of the BS patients and the controls. Following the documentation of the differentially expressed gene (DEG) sets, the gene expression data was further analysed with analysis/visualization and bioinformatics enrichment tools. Validation of the microarray data on selected genes was performed using quantitative real-time PCR. When *p* and fold change (FC) values were chosen as ≤0.05 and ≥2.0 respectively, class comparison analyses yielded the following numbers of DEGs; B vs C: 28, M vs C: 20, O vs C: 8, V vs C: 555, M vs O: 6, M vs V: 324, O vs V: 142. Venn diagram analysis showed only two genes, namely *CLEC12A* and *IFI27* in the intersection M vs C ∩ O vs C ∩ V vs C. Another noteworthy gene appeared as *CLC* in the DEG sets. Cluster analyses successfully clustered distinct clinical phenotypes of BS. The gene ontology term enrichment analyses documented innate immune response related biological processes in the M group, while adaptive immune responses were significantly enriched in the O and V groups. When BS patients with different clinical phenotypes are collectively analyzed, important data especially at the molecular level seems to be lost. Distinct clinical phenotypes of BS patients display distinct expression profiles and this is strikingly apparent with M vs V and O vs V comparisons. In Turkish patients with BS, expression differences regarding the genes *CLEC12A*, *IFI27* and *CLC* seem to be operative in the disease pathogenesis. Mucocutaneous BS, which is generally regarded as located at the "mild" end of BS disease spectrum, demonstrates enrichment in innate immune response processes. On the contrary, ocular and vascular BS phenotypes which are located at the "severe" end of the disease spectrum show enrichment of adaptive immune response headings. Based on these findings, future research should take into consideration the immunogenetic heterogeneity of BS phenotypes. Two antiinflammatory genes, namely *CLEC12A* and *CLC* may prove valuable as therapeutic targets and help with the design of an experimental model in BS.

2021, 124 pages

Keywords: Behçet's syndrome, innate immunity, adaptive immunity, gene expression, *CLEC12A*, *CLC*, *IFI27*, microarray

TEŞEKKÜR

"… Tez yazacak kişiye, çok keyifli olmadığını, yaşamlarının bir süre için karışık bir hal alacağını, arkadaşlarından ve sosyal yaşantılarından bir süre için vazgeçmeleri gerekeceğini söylemelisiniz." (Anonim)

Bu tezin yazılması da bir istisna olmadı ve ancak, burada isimlerini anarak kendilerine teşekkür etme fırsatı bulduğum ya da tamamen kasıtsız olarak isimlerini anmayı unuttuğum çok sayıdaki özel insanın yardım ve desteğiyle başarılabildi.

Değerli Hocam Prof. Dr. Nejat Akar'a, temel bilimler alanında yeni şeyler öğrenmek üzere arayış içinde olduğum bir sırada beni Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki doktora programına kabul ettiği, bir Hekim ve Bilim İnsanı'nın esasında nasıl olması ve nasıl düşünmesi gerektiğini yaşayarak öğrettiği ve doktora eğitimim süresince gerçekleştirdiği harika yol göstericiliği için,

Değerli Hocalarım Prof. Dr. Hilal Özdağ, Prof. Dr. Aysel Gürler ve Prof. Dr. Aykut Özkul'a, doktora eğitimi süremin tamamı boyunca tereddüt etmeden paylaştıkları çok değerli bilgi ve tecrübeleri ile gösterdikleri büyük sabır ve anlayış için,

Değerli Hocam Blm. Uzm. Seda Taşır Yılmaz'a, bilimin "mutfağı" sayılan laboratuvara ait kıymetli bilgi ve tecrübelerini sürekli olarak paylaşarak bana öğrettikleri ve deneylerim için sağladığı hayati katkı için,

Biyoteknoloji Enstitüsü'nün tüm değerli Öğretim Üyeleri'ne, her zaman korudukları yardımsever tutumları ve gösterdikleri güler yüz için,

Biyoteknoloji Enstitüsü'nün tüm değerli İdari Personel'ine, bu arada özellikle de Öğrenci İşleri Koordinatörü Sn. Asuman Erzincan'a, tüm yoğun mesaileri sırasında, bir taraftan da benim ve diğer "dalgın" Biyoteknoloji Enstitüsü öğrencilerinin başına gelebilecek "kazaları" önleme konusunda gösterdikleri titizlik, hoşgörü ve sağladıkları yardımlar için,

Canım anneme, değerli eşime ve biricik oğluma, kendilerine ayırmam gereken zamanın önemli bir bölümünü doktora ve tez çalışmalarına ayırdığım halde hiç sitem etmedikleri ve her zaman yaptıkları gibi, tüm imkan ve güçleriyle yanımda durarak bana verdikleri büyük destek için,

Şükranlarımı sunuyorum.

Sizler olmasaydınız bu tez de olmazdı.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... İİ
ONAY ..... İİİ
ÖZET ..... İV
ABSTRACT V
TEŞEKKÜR ..... Vİ
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... İX
ÇİZELGELER DİZİNİ X
KISALTMALAR DİZİNİ ..... Xİ
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 2
2.1. PROFESÖR DOKTOR HULUSİ BEHÇET'İN HAYATI 2
2.2. BEHÇET SENDROMU'NUN TANIMI 3
2.3. BEHÇET SENDROMU EPİDEMİYOLOJİSİ 3
2.4. BEHÇET SENDROMU'NUN ETİYOLOJİSİ 4
2.5. BEHÇET SENDROMU PATOGENEZİ 6
2.6. BEHÇET SENDROMU KLİNİĞİ 10
2.7. BEHÇET SENDROMU'NUN LABORATUVAR BULGULARI 12
2.8. BEHÇET SENDROMU'NUN TANI VE AYIRICI TANISI 13
2.9. BEHÇET SENDROMU'NUN TEDAVİSİ 14
2.10. BEHÇET SENDROMU'NUN PROGNOZU 15
3. GEREKÇE VE AMAÇ 16
4. MATERYAL VE YÖNTEM 18
4.1. ETİK KURUL ONAYI, ÇALIŞMAYA KATILAN MERKEZLER VE BEHÇET SENDROMLU OLGULAR İLE KONTROL GRUBU BİREYLERİNİN SEÇİLMESİ 18
4.2. BEHÇET SENDROMLU OLGULAR İLE KONTROL GRUBU BİREYLERİNİN KLİNİK BİLGİ VE KAN ÖRNEKLERİNİN TEMİNİ 19
4.3. BEHÇET SENDROMU ALT GRUPLARININ TANIMLANMASI 19
4.4. TEMEL DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERE AİT İSTATİSTİK ANALİZLER 19
4.5. TAM KAN ÖRNEKLERİNDEN RNA İZOLASYONU 20
4.6. RNA MİKTAR VE KALİTE ANALİZLERİ 20
4.7. BİYOTİNLE İŞARETLENMİŞ VE FRAGMENTE EDİLMİŞ HEDEF RNA HAZIRLANMASI 22
4.8. HİBRİDİZASYON 24
4.9. MİKRODİZİNLERİN YIKANMA, BOYANMA VE TARANMASI 24
4.10. SEÇİLMİŞ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ İÇİN QRT-PCR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN GEÇERLİ KILMA DENEYLERİ 25

4.11. MİKRODİZİN VERİSİ ÜZERİNDEKİ ÖN İŞLEM BASAMAKLARI 26
4.12. GEN İFADE VERİLERİNİN ANALİZİ 27
4.13. FARKLI İFADEYE SAHİP GENLERİN LOKUSLARI İLE GENOM BOYU İLİŞKİLENDİRME VE GENOM BOYU BAĞLANTI ÇALIŞMALARINDA TANIMLANMIŞ OLAN LOKUSLARIN KESİŞİMİ 28
5. ARAŞTIRMA BULGULARI 29
5.1. BEHÇET SENDROMLU OLGULARIN VE KONTROL GRUBUNUN TEMEL DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ 29
5.2. ÇALIŞMA GRUBUNUN DETAYLI DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ 29
5.3. KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ İÇİN KULLANILAN PROB SET SAYISI 29
5.4. SINIF KARŞILAŞTIRMASI ANALİZLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR 31
5.5. BEHÇET SENDROMU ALT GRUPLARINA AİT KÜMELEME ANALİZLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR 33
5.6. GEN ONTOLOJİSİ ANALİZLERİNE AİT BULGULAR 35
5.7. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN GEÇERLİ KILMA DENEYLERİNE AİT BULGULAR 36
5.8. GENOM BOYU İLİŞKİLENDİRME VE GENOM BOYU BAĞLANTI ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR İLE KESİŞİMLER 36
6. TARTIŞMA 38
KAYNAKLAR 52
EKLER 76
EK 1 Etik Kurul Değerlendirme Formu 76
EK 2 Olgu Rapor Formu 78
EK 3 RNA ve aRNA Analizleri 80
EK 4 “Experiment Descriptor File” 81
ÖZGEÇMİŞ 82
TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 94

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet 2
ŞEKİL 4.1. Çalışmanın in vitro deneylerini özetleyen akış şeması 21
ŞEKİL 4.2. Seçilmiş 20 adet RNA örneğine ait agaroz jel görüntüleri 22
ŞEKİL 4.3. "GeneChip® 3' IVT Express Kit" protokolünün şematik gösterimi 23
ŞEKİL 4.4. Çalışmaya ait 44 adet amplifiye edilmiş RNA örneğinin fragmentasyon işlemi sonrasındaki jel görüntüleri 23
ŞEKİL 4.5. Çalışmanın biyoinformatik analizlerini özetleyen akış şeması 27
ŞEKİL 5.1. Behçet sendromu alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmalarında elde edilen gen setleri ile gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramı. 33
ŞEKİL 5.2. Behçet sendromu alt grupları arasında gerçekleştirilen kümeleme analizlerine ait dendrogram ve ısı haritası gösterimleri 34

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2.1. Uluslararası Çalışma Grubu Behçet Hastalığı Tanı Kriterleri 13
ÇİZELGE 2.2. Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri 13
ÇİZELGE 4.1. Uluslararası Çalışma Grubu tarafından geliştirilen Behçet hastalığı tanı kriterleri 18
ÇİZELGE 4.2. Behçet sendromu alt gruplarına ait kriterler 19
ÇİZELGE 4.3. Geçerli kılma deneyleri için seçilen genler ve ilgili polimeraz zincir reaksiyonu primerlerine ait detaylar 26
ÇİZELGE 5.1. Behçet sendromlu olguların ve kontrol grubunun temel demografik özellikleri 29
ÇİZELGE 5.2. Behçet sendromlu olgular ile kontrol grubunda yer alan bireylerin detaylı demografik ve klinik özellikleri 30
ÇİZELGE 5.3. Sınıf karşılaştırması analizlerinde belirlenen farklı ifadeye sahip gen sayıları 31
ÇİZELGE 5.4. Sınıf karşılaştırması analizlerinde belirlenen ve FC değerlerine göre sıralanmış ilk 20 farklı iafdeye sahip gen 32
ÇİZELGE 5.5. Gen ontolojisi analizlerine ait bulgular 35
ÇİZELGE 5.6. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilen geçerli kılma deneylerine ait bulgular 36
ÇİZELGE 5.7. Genom boyu ilişkilendirme ve genom boyu bağlantı çalışmalarına ait lokuslar ile farklı ifade düzeyine sahip oldukları gösterilen genlerin kesişimleri 37
ÇİZELGE 6.1. Literatürde yer alan ve Behçet sendromu durumunda genom boyu ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler 39
ÇİZELGE 6.2. *IFI27* ve *CLEC12A* genlerine ait sınıf karşılaştırması analizlerinde ulaşılan FC değerleri 43

KISALTMALAR DİZİNİ

%GC	Guanin sitozin yüzdesi (içeriği)
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
A_{260}	260 nm dalga boyunda absorbans değeri
A_{280}	280 nm dalga boyunda absorbans değeri
AA	Amiloid A proteini
AGCC	"Affymetrix GeneChip Command Console" yazılımı
ANA	Antinükleer antikor
aRNA	Amplifiye RNA
B	Tüm Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
BS	Behçet sendromu
C	Kontrol grubu
CD	Yüzey farklılaşma antijenleri ("Cluster of Differentiation")
cDNA	Komplementer / tamamlayıcı DNA
CpG	Sitozin guanin dinükleotit dizisi / dizileri
cRNA	Komplementer RNA
CRP	C-reaktif protein
D	Mukokütan, oküler ve vasküler Behçet sendromu olguları dışındaki Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DVT	Derin ven trombozu
ESH	Eritrosit sedimantasyon hızı
FC	Kat değişimi ("Fold Change")
GEO	"Gene Expression Omnibus" veritabanı
GO	Gen ontolojisi ("Gene Ontology")
GWAS	Genom boyu ilişkilendirme çalışması ("Genome-wide Association Study")
GWLS	Genom boyu bağlantı çalışması ("Genome-wide Linkage Study")
HLA	İnsan lökosit antijeni ("Human Leukocyte Antigen")
HSP	Isı şoku proteini ("Heat Shock Protein")
ICBD	Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri ("International Criteria for Behçet's Disease")
IFN	İnterferon (için kısaltma, örneğin, IFN- γ)

IL	İnterlökin (için kısaltma, örneğin, IL-1)
ISG	Uluslararası Çalışma Grubu (“International Study Group”)
IVT	İn vitro transkripsiyon (“In vitro transcription”)
M	Mukokütan Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
MBS	Mukokütan Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
mg	Miligram
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi (“Major Histocompatibility Complex”)
miRNA	MikroRNA
mRNA	Haberci RNA
NET	Nötrofil hücre dışı tuzağı (“Neutrophil Extracellular Trap”)
nm	Nanometre
ng	Nanogram
NK	“Doğal katil” (“Natural Killer”)
O	Oküler Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
OBS	Oküler Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
qRT PCR	(Kantitatif) eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (“Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction”)
RF	Romatoid faktör
RIN	RNA bütünlük sayısı (“RNA Integrity Number”)
RMA	“Robust Multi-array Average” normalizasyon algoritması
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (“Revolutions per minute”)
SAPE	Streptavidin-fikoeritrin
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (“Single nucleotide polymorphism”)
SSS	Santral sinir sistemi
Th1	Yardımcı T hücresi tip 1
Th17	Yardımcı T hücresi tip 17
Tm	Erime sıcaklığı (“Melting temperature”)
TNF	Tümör nekroz faktörü
V	Vasküler Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu
VBS	Vasküler Behçet sendromu olgularını içeren hasta grubu

1. GİRİŞ

Behçet sendromu (BS), bir Türk hekimi olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tanımlanmış olmasının dışında, ülkemizde sık görülüyor olması ve oluşturabildiği sakatlık ve hayati tehlike nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur (1–8). Tanımlanmasından günümüze kadar seksen yılın üzerinde bir süre geçmiş olmasına rağmen, BS ile ilgili henüz cevaplanmayı bekleyen çok sayıda önemli soru mevcuttur. Cevaplanmayı bekleyen bu soruların başında, BS'nin [1] bir hastalık mı yoksa sendrom mu olduğu, [2] nasıl sınıflandırılması gerektiği ve [3] olası etiyopatogenezi yer almaktadır. Temelde doğal bağışıklık sistemi aracılıklı enflamatuvar bir hastalık olduğu düşünülen BS'nin, tüm çalışmalarda ortak, tutarlı bir bağışıklık sistemi anormalliği göstermiyor olması, ülkeden ülkeye ve etnik gruplar arasında farklı klinik özellikler sergilemesi ve BS olgularının hastalık özelliklerine göre farklı öbeklerde toplanabiliyor olması, bu sorulara cevap bulunmasını zorlaştırmaktadır (9,10). Behçet sendromu'na ait hastalık mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılması, hem bu sorulara cevaplar bulunmasına, hem de BS için özgün ve etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Mikrodizin teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen genom boyu ifade analizleri, aralarında enflamatuvar ve neoplastik hastalıkların da bulunduğu birçok kompleks hastalık durumunda, hastalık mekanizmaları ile ilgili moleküler düzeyde önemli bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır (11). Hastalık ve kontrol grupları arasında farklı ifade edilen gen setlerinin ortaya konması, biyoinformatik araçlar yardımıyla bu gen setleri kullanılarak gerçekleştirilen kümeleme, zenginleşme ve yolak analizleri, söz konusu kompleks hastalıkların patogenezlerine ışık tutmuştur (10). Bu çalışmaların bir kısmı da, tedavi amaçlı olarak büyük potansiyel taşıyan, hedefe yönelik yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesini mümkün kılmıştır.

Bu çalışmada mikrodizin teknolojisi kullanılarak, Türk BS olgularında ve uyumlu seçilmiş sağlıklı kontrol grubunda karşılaştırmalı bir genom boyu ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular farklı biyoinformatik araçlarla değerlendirilerek, Türk BS olgularında rol oynayan moleküler hastalık mekanizmaları ortaya konmaya çalışılmış ve yukarıda işaret edilen sorulara cevap aranmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. PROFESÖR DOKTOR HULUSİ BEHÇET'İN HAYATI

Ordinaryüs Profesör Doktor Hulusi Behçet'in biyografisi Profesör Doktor Türkan Saylan tarafından yazılmıştır (Şekil 2.1.) (12). Özetle bu yazıdan öğrendiğimize göre; "*Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet 1889 yılında İstanbul'da doğmuştur. Üniversite öncesi eğitimine o tarihlerde bir Osmanlı şehri olan Şam'da devam eden Hulusi Behçet, tıp eğitimini Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde tamamlayarak, 21 yaşında Tıp Doktoru ünvanını almaya hak kazanmıştır. Akademiden mezuniyeti sonrasında uzmanlık eğitimini Dermatoloji ve Venereoloji alanında sürdüren Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet, I. Dünya Savaşı yıllarında Edirne Askeri Hastanesi'nde görev yapmıştır. İzleyen yıllarda, iyi Almanca bilgisiyle Budapeşte ve Berlin'de çalışarak mesleki bilgi ve tecrübesini arttıran Hulusi Behçet, İstanbul'a dönerek 1933 yılında İstanbul Üniversitesi'nin kuruluşunda görev almış ve Gureba Hastanesi'ndeki Dermatoloji Kliniği'nin oluşturulması ve geliştirilmesinde ilk Dermatoloji ve Venereoloji Profesörü olarak büyük katkılar sağlamıştır. Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet, Türk akademik hayatında ilk Profesör ünvanını alan bilim insanımız olarak tanınmaktadır. Hulusi Behçet, yakın çevresindekiler tarafından her zaman coşkulu bir hoca ve üretken bir yazar olarak tanımlanmıştır. 1937 yılında, günümüzde hala kendi ismi ile bilinen Behçet Hastalığı'nı dünya tıp literatürüne kazandıran Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet, 1947 yılında, yoğun çalışma ve çok sayıdaki başarıyı barındıran bir kariyeri takiben emekli olmuştur. Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet ne yazık ki sadece bir yıl sonra, 1948 yılında, İstanbul'da aramızdan ayrılmıştır.*" (12).

Şekil 2.1. Ord. Prof. Dr. Hulusi Behçet (1889-1948)[1]

[1] 23 Nisan 2021 tarihinde "www.hulusibehcet.net" isimli internet sitesinden alınmıştır.

2.2. BEHÇET SENDROMU'NUN TANIMI

Behçet sendromu ilk kez 1937 yılında Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından oral ülserleri, genital ülserleri ve üveiti içeren bir üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (1). Günümüzde ise BS, ilgili literatürde tutarlı tek bir şekilde tanımlanmamaktadır. Daha yaygın kabul gören tanımıyla BS, etiyolojisi bilinmeyen, kronik, alevlenme ve yatışma dönemleriyle seyreden, multisistemik enflamatuvar bir hastalıktır (9). Sınıflandırılması gerektiğinde ise BS, bir vaskülit ya da bir kompleks otoenflamatuvar sorun olarak sınıflandırılmaktadır (13,14). Behçet sendromu'na ait patolojinin en belirgin özelliğini oluşturan damar tutulumu, her seferinde belirgin bir enflamasyon ve damar zedelenmesi barındırmadığından, vaskülit yerine bir "vaskülopati" tanımlaması da öne sürülmüştür. Bu görüşe göre BS, her boyuttaki arter ve venin etkilenebildiği, endotelyal fonksiyonların immünolojik mekanizmalarla bozulduğu ve her zaman zedelenmeyle sonuçlanmayan bir damar anormalliğidir (vaskülopati) (15).

Değinilmesi gereken önemli bir nokta, günümüzde BS için literatürde halen ayrı ayrı kullanılmakta olan "Behçet hastalığı" ve "Behçet sendromu" isimlendirmeleri ile bu konuya dair bir görüş birliğinin halen sağlanamamış olmasıdır. Behçet sendromu olgularının klinik özelliklerine göre oluşturulan öbeklerinde moleküler hastalık mekanizmalarının birbirinden farklı olduğunun gösterilmiş olması, yine BS'nin yapılan çalışmalarında ortak ve tutarlı bir bağışıklık sistemi anormalliği sergilemiyor olması ve BS'ye ait klinik özelliklerin ülkeler ve etnik gruplar arasında farklılıklar göstermesi, "sendrom" şeklindeki bir isimlendirmeyi desteklemektedir (10,16). Bununla birlikte, BS ile ilgili çalışmalarda isimleri öne çıkan bazı bilim insanlarının da aralarında bulunduğu çok sayıdaki araştırmacı, halen "hastalık" şeklindeki bir isimlendirmeyi tercih ediyor ve koruyor olarak görülmektedir (15). Konunun önemi, bu başlık için verilecek kararın, BS ile ilgili planlanacak araştırma çalışmalarının tasarımını etkileyecek olmasıdır (10).

2.3. BEHÇET SENDROMU EPİDEMİYOLOJİSİ

Behçet sendromu, Doğu Akdeniz havzasından başlayarak İpek Yolu boyunca Japonya'ya doğru uzanan bir coğrafya üzerinde sık olarak görülmektedir (2,4). Bu nedenle zaman zaman "İpek Yolu hastalığı" olarak da isimlendirilmiştir. Behçet sendromu'na ait en yüksek prevalans değerlerinin bildirildiği iki ülkeden biri ülkemiz iken, diğeri ise Ürdün olarak rapor edilmiştir (3,4,17). Dikkat çekici ve önemli bir özellik olarak, söz konusu

karakteristik coğrafi dağılım, dünya üzerindeki insan lökosit antijeni-B51 (HLA-B51) aleli sıklığı ile güçlü bir birliktelik göstermektedir (2,4,18). Dünya üzerindeki her bölgeden bildirilmiş olmakla birlikte, BS klasik coğrafyası dışındaki diğer bölgelerde önemli ölçüde düşük oranlarla izlenmektedir. Sendromun sık görüldüğü coğrafya üzerinde erkek/kadın oranı eşit civarda seyretmekte ve BS özellikle genç erkek olgularda şiddetli seyir özellikleri sergilemektedir (5,6). Behçet sendromu başlangıç yaşı olarak sıklıkla 20-30 yaş aralığını seçmekte ve çocukluk döneminde çok nadir olarak belirlenmektedir (19–21).

2.4. BEHÇET SENDROMU'NUN ETİYOLOJİSİ

Behçet sendromu'nun etiyolojisi henüz kesin olarak bilinmemekte ve günümüzde BS daha çok multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu görüşe göre BS gelişimi ve izleyen alevlenme dönemleri, kompleks bir genetik zemine bağlı hastalık yatkınlığı bulunan bireylerde, çeşitli çevresel antijenler (örneğin, streptokokal, viral) tarafından tetiklenmektedir (9).

Ailevi kümelenmeye ve kardeşler arasında birden fazla hastanın tespit edilebilmesine ait gözlemler, uzun bir süredir, BS gelişiminde genetik faktörlerin rol oynadığına işaret etmekteydi (22). Günümüze kadar, BS ile en güçlü birlikteliği gösteren genetik faktör HLA-B51 pozitifliği olarak ortaya çıkmıştır (18,23). Bununla birlikte, BS gelişiminde HLA-B51'in nasıl bir rol oynadığı henüz kesin olarak ortaya konamamıştır. Güncel kanıtlar, HLA-B51 aleli ile Endoplazmik Retikulum İlişkili Aminopeptidaz 1 (*ERAP1*) gen polimorfizmleri arasında epistatik bir etkileşim bulunduğuna ve BS gelişiminde, majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I proteinlerine peptit bağlanma sürecinin kritik bir rol oynadığına işaret etmektedir (24,25).

Behçet sendromu gelişimine katkıda bulunan genetik faktörleri araştıran çalışmalar sırasında, MHC lokusu dışında yer alan, çok sayıdaki farklı genomik bölgeye ait bulgulara da ulaşılmıştır. Gerçekleştirilen genom boyu ilişkilendirme (GWAS) ve bağlantı (GWLS) çalışmaları, aralarında (alfabetik sırayla) *ADO-EGR2*, *CCR1-CCR3*, *CEBPB-PTPN1*, *ERAP1*, *FUT2*, *GIMAP2/GIMAP4*, *IL-1α/IL-1β*, *IL-10*, *IL-23R-IL-12RB2*, *IRF8*, *KLRC4*, *LACC1*, *MEFV*, *NOD2*, *RIPK2*, *STAT4*, *TLR4*, *TNFAIP3* ve *UBAC2* genlerinin de bulunduğu çok sayıdaki gen/gen bölgesi ile olası eşliği ortaya koymuştur (9,24,26–28). Bu hastalık yatkınlık genlerine ait risk allellerinin neden olduğu haberci RNA (mRNA) ifade ya da protein fonksiyon değişikliklerinin BS gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

Söz konusu genler incelendiğinde, sadece doğal bağışıklık yanıtına ait genler olmadıkları, aynı zamanda aralarında adaptif bağışıklık yanıtı için önem taşıyan genlerin de bulunduğu görülmektedir.

Uzun bir süredir, BS gelişiminde olası bir enfeksiyöz etiyoloji üzerinde durulmaktadır (29,30). Prof. Dr. Hulusi Behçet BS'yi ilk kez tanımladığı yazısında, muhtemel bir viral etiyolojiye işaret etmişti (1). Öne sürülen bu viral etiyoloji, günümüze kadar kesin olarak gösterilememiş olsa da halen üzerinde durulmakta ve çalışmalara konu olmaktadır (31). Virüsler dışında muhtemel BS etiyolojisinde suçlanan diğer önemli enfeksiyöz ajan streptokok suşları ve özellikle de *Streptococcus sanguinis* olmuştur (29,30). Streptokokların olası rolleri ile ilgili olarak, [1] streptokok antijenlerine karşı aşırı duyarlılık ve [2] streptokok antijenleri ile insan ısı şok proteinleri (HSP) arasındaki moleküler benzerlik (çapraz reaksiyon) hipotezleri öne sürülmüştür (32,33).

Oğuz ve arkadaşlarının Portekizli BS olguları ile kontrol grubuna ait genom boyu ifade verisi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, BS olguları ile kontrol grubu karşılaştırmasında farklı ifade düzeylerine sahip oldukları gösterilen genlerin, sadece doğal bağışıklığa ait olmadıkları ve aralarında çok sayıda adaptif bağışıklık geninin de bulunduğu gösterilmiştir (10). Aynı çalışmaya ait gen ontolojisi analizlerinde ise, oküler BS grubunda, özellikle mikroorganizmalara karşı bağışıklık yanıtı ile ilgili yolakların zenginleşme göstermesi, önemli bir diğer bulgu olarak dikkati çekmektedir (10).

Birçok enflamatuvar hastalık için olduğu gibi, BS durumunda da epigenetik faktörler araştırılmıştır (34,35). Hughes ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen güncel bir epigenom boyu ilişkilendirme çalışmasında, BS olguları ile kontrol grubu bireyleri arasında, monositlerde 383, CD4+ T lenfositlerde ise 125 adet sitozin guanin dinükleotid dizisi (CpG) bölgesinde metilasyon farklılığı bulunduğu belirlenmiştir (36). Aynı çalışmada elde edilen bir diğer önemli bulgu da BS olgularında belirlenen bu metilasyon farklılıkların, tedavi ile, sağlıklı kontrol grubuna yaklaşacak şekilde düzelme göstermesiydi (36). Behçet sendromu ile ilgili olarak DNA metilasyonu dışında, histon modifikasyonları, mikroRNAlar (miRNA) ve mikrobiyata değişiklikleri de üzerinde durulan ve araştırmaları süren epigenetik faktörler arasında yer almaktadır (37,38).

2.5. BEHÇET SENDROMU PATOGENEZİ

Behçet sendromu patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Önceki yıllarda ağırlıklı olarak doğal bağışıklık aracılığı ile geliştiği düşünülen BS'nin günümüzde, aynı zamanda önemli adaptif bağışıklık yanıtlarını da barındırdığı bilinmektedir (9,10,30,39). Çok sayıda BS çalışmasında ortak ve tutarlı bir şekilde varlığı gösterilen hiperenflamatuvar bir ortamda, görünürde nedensiz olarak gelişen BS ataklarının hangi mekanizmalarla tetiklendiği henüz açıklanmayı beklemektedir. Otoimmünite ile uyumlu bulgularının esas (birincil) anormallik olmaktan çok, şiddetli, uzun süreli ve tekrarlayıcı doku zedelenmesi sonucunda (ikincil) geliştiği düşünülen BS, ağırlıklı olarak bir kompleks otoenflamatuvar sorun olarak değerlendirilmektedir (40). Behçet sendromu durumunda çalışmaların ortak, tutarlı bir bağışıklık sistemi anormalliği göstermiyor olması, sendromun etnik gruplar arasında klinik özellikler açısından farklılıklar sergilemesi ve olguların klinik özelliklerine uygun farklı öbeklerde toplanabiliyor olması, tüm BS olguları için geçerli olacak, ortak ve tek bir patogenez olasılığını zayıflatmaktadır (9,10). Bununla birlikte günümüzde, çevresel (mikrobiyal) ve/veya kendi antijenlerine karşı gelişen proenflamatuvar, doğal bağışıklık orijinli bir aktivasyonun, adaptif bağışıklık yanıtlarıyla sürdürülmesine yol açan kompleks bir genetik zeminin, BS'deki esas patogenetik mekanizma olduğuna inanılmaktadır (41).

Yukarıda da Behçet sendromu'nun etiyolojisinde değinilmiş olduğu gibi, BS gelişiminde bir mikrobiyal enfeksiyonun olası rolüne, sendromun tanımlandığı ilk günden itibaren işaret edilmiştir (1). Olası mikrobiyal rol ile ilgili olarak [1] bakteriyel, [2] viral, [3] HSP aracılıklı indirekt ve [4] çapraz reaksiyon (moleküler benzerlik) etiyolojilerini içeren 4 önemli hipotez öne sürülmüştür (42). Oral mikrobiyal flora ve bu floranın önemli bir üyesi olan streptokoklar, püstüler deri lezyonları ve aralarında herpes simpleks, su çiçeği, sitomegalovirüs, Epstein-Barr, insan herpes virüsü 6 ve 7'nin de bulunduğu çok sayıdaki virüs, konuyla ilgili olarak suçlanan mikrobiyal ajanlar olmuşlardır (43).

Behçet sendromu için karakteristik olarak kabul edilen hipopiyon, paterji reaksiyonu ve püstüler deri lezyonlarının yoğun bir şekilde nötrofil lökositleri barındırıyor olması, BS patogenezinde nötrofillerin ve nötrofil fonksiyonlarının uzun bir süredir sorumlu tutularak araştırılmasına yol açmıştır (44,45). İlginç olarak ilgili literatürde, nötrofil-endotel hücresi etkileşimini, nötrofil kemotaksis ve fagositozunu ve nötrofil sentez ve sekresyon fonksiyonlarını ilgilendiren, birbirleriyle çelişen bulgular mevcuttur (30,46,47). Söz konusu çelişkili bulguların, çalışmalar arasında farklılık gösterebilen BS klinik aktivitesi,

“in-vitro” bulgular ile gerçek “in-vivo” durum arasındaki uyumsuzluk, standardize edilemeyen ilaç etkileri ve kullanılan farklı laboratuvar metodolojileri ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür (30). Tüm bu olası açıklamalara rağmen Oğuz ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri genom boyu ifade çalışmasında ilave bir bulgu olarak, BS alt grupları arasında nötrofil fonksiyonlarının farklı derecelerde öneme sahip olabileceğine ve nötrofil kaynaklı bazı peptitlere ait ifade düzeylerinin birbirlerinden farklı yönlerde değişim gösterebileceğine işaret etmiştir (10). Behçet sendromu durumunda varlığı gösterilmiş olan enflamatuvar sitokin ortamının, nötrofiller üzerinde kısmi bir aktivasyon etkisi oluşturabileceği öne sürülmüştür. İlave olarak, BS için geliştirilmiş bir hayvan modeli olan HLA-B51 transgenik farelerde, uyarılmış nötrofillerden artmış süperoksit salınımı, gösterilebilen tek anormallik olarak dikkat çekmiştir (48). Son dönemde giderek önemi artan ve daha çok araştırılan bir nötrofil fonksiyonu da nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET) oluşumudur. Behçet sendromu olgularına ait nötrofillerin in-vitro ortamda spontan olarak NET oluşturmaya daha yatkın oldukları ve kolşisin ve deksametazon (bir kortizon türevi) isimli tedavi ajanlarının ise bu özelliği inhibe ettiği bildirilmiştir (49). Nötrofil ekstraselüler tuzakları ile ilgili bir diğer önemli gelişme ise, bugün artık “immünotromboz” olarak isimlendirilen bir süreçle, nötrofillerin NET aracılı arteriyel ve venöz trombozlara yol açabildiklerinin gösterilmiş olmasıdır (50).

γδ T lenfositleri, T hücre reseptörü olarak γ ve δ heterodimeri bulunduran, periferik kan T lenfositlerinin yaklaşık olarak %1-10 kadarını oluşturan ve bir bölümü de peptit yapılı olmayan bakteriyel antijenleri tanıma yeteneğine sahip, doğal bağışıklık hücreleridir. Bugün γδ T lenfositlerinin, özellikle deri ve mukoza yüzeylerinde mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattında yer alarak, doğal bağışıklıkta önemli rol oynadıklarına inanılmaktadır (51). Birçok çalışmada BS olgularında, periferik kan γδ T lenfositlerinin poliklonal tarzda bir artış gösterdiği ortaya konmuştur (52,53). Bu durum, tekrarlayan enflamasyon atakları sırasında γδ T hücrelerinin, çok sayıda birbirinden farklı antijenik uyarıya karşı yanıt oluşturduğuna işaret etmektedir. Aynı zamanda, HSP60 proteini ifadesinin artmış olduğu aktif BS lezyonlarında izlenen belirgin γδ T lenfosit infiltrasyonu da olası bir HSP60 - γδ T lenfosit etkileşimini düşündürmektedir (54). Önemli bir başka bulgu olarak γδ T hücrelerinin, nötrofillerin bir aktivatörü ve enflamatuvar özellikte bir sitokin olan interlökin 17 (IL-17) salgıladığı da gösterilmiştir (55).

Yapılan çalışmalarda “Natural Killer” (“doğal katil”) (NK) lenfositlerin BS alevlenme dönemlerinde önemli ölçüde artış gösterdiği bildirilmiştir (56,57). Aynı zamanda, BS

olgularına ait bu NK lenfositlerin yardımcı T hücresi tip 1 (Th1) yönünde polarizasyon gösterdikleri ve hastalığın alevlenme dönemleri sırasında, daha yüksek düzeylerde tümör nekroz faktörü α (TNF-α), interferon γ (IFN-γ) ve IL-2 salgıladıkları da bilinmektedir (58,59). Bunlar dışında BS'nin HLA-B51 ile sergilediği güçlü birliktelik, NK ve T lenfositler arasında, HLA sınıf I bağlayan NK reseptörleri aracılığı ile ortaya çıkan bir düzenlemeye de işaret ediyor olarak görülmektedir (41).

Behçet sendromu durumunda, periferik kan ve lezyonlu doku örneklerinde, T lenfosit varlığı ve aktivasyonuna ait bulgular izlenmektedir. Periferik kan CD4+ ve CD8+ T lenfosit gruplarında izlenen oligoklonal artışın, T hücre reseptörü değişken bölgelerinde BS olguları arasında belirlenen yüksek derecedeki farklılık nedeniyle, çok sayıdaki farklı antijenik uyarılara bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (60,61). Diğer birçok vaskülit sendromunda olduğu gibi BS'de de Th1 tipindeki bir proenflamatuvar sitokin profili (TNF-α, IFN-γ ve IL-2) baskın görünmektedir (62). Aynı bulguyu destekleyecek şekilde, olgun naif T lenfositlerden Th1 tipi lenfositlerin farklılaşmasına aracılık eden IL-12 ve IL-23 düzeyleri, BS'li olguların periferik kan ve lezyonlu doku örneklerinde yüksek olarak bulunmaktadır (63,64). Yardımcı T hücresi tip 17 (Th17) tipi T lenfositler, göreceli olarak daha yeni tanımlanmış bir T lenfosit popülasyonunu oluşturmaktadır. Nötrofilik ve monositik enflamasyona, ekstraselüler mikroorganizmalara karşı bağışıklık yanıtına ve organa özgü otoimmün reaksiyonlara aracılık eden Th17 tipi lenfositler karakteristik olarak IL-17, IL-22 ve TNF-α salgılamaktadır (65). Behçet sendromu ile ilişkili enflamatuvar lezyonların gelişiminde, Th17 tipi T lenfositlerin önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (66,67). Alevlenme döneminde bulunan BS olgularında IL-17 düzeylerinin, yatışma döneminde bulunan olgulara oranla belirgin ölçüde yüksek bulunması, BS patogenezindeki Th17 tipi lenfosit rolünü destekler görünmektedir (68). Behçet sendromu'nun tedavisi için kullanılan interferon, siklosporin ve TNF-α antagonisti gibi farklı etki mekanizmalarına sahip ajanların, Th17 tipi lenfosit yanıtlarını baskıladıkları da gösterilmiştir (66,67).

Behçet sendromlu olgularda izlenebilen T lenfosit aracılıklı otoimmünite için, retinada bulunan S-antijeni'ne yönelik T lenfosit yanıtı, güzel bir örnek teşkil etmektedir. Literatürde de yer aldığı gibi, üveiti olan BS'li olgularda, S-antijeni'ne yönelik T lenfosit yanıtları belirlenebilmektedir (69). Daha da önemli olarak, S-antijeni'nin bağışıklık yanıtı oluşturma açısından baskın epitoplarından birisi olan ve PDSAg olarak isimlendirilen peptit fragmanı, HLA-B moleküllerine (örneğin, HLA-B51 ve HLA-B27) ait korunmuş bir

bölge (B27PD) ile önemli bir homoloji sergilemektedir (70). Bu korunmuş amino asit dizisi tarafından oluşturulan epitop, CD4+ T lenfositlere sunularak bu hücreler tarafından tanındığı için, HLA sınıf I moleküllerinin bizzat kendilerinin antijenik epitoplar olarak rol oynadıkları bir hastalık modeli de öne sürülmüştür (71).

Adaptif bağışıklık sisteminin bir diğer önemli hücre grubunu oluşturan düzenleyici T lenfositleri de BS'de çalışılmıştır. Bağışıklık sisteminin farklı bileşenleri durumunda gözlendiği gibi, BS'de de düzenleyici T lenfositleri ile ilgili olarak birbiriyle çelişkili olabilecek bulgulara ulaşılmıştır. Örneğin, alevlenme döneminde değerlendirilen BS olgularının periferik kan örneklerinde düzenleyici T hücreleri artmış olarak bulunurken, bir başka çalışmada oküler atak öncesinde aynı hücre grubunun azalmış olduğu gösterilmiştir (72,73). Behçet sendromu'nun proenflamatuvar tabiatını göz önünde bulundurarak Hamzaoui ve arkadaşları, BS'de düzenleyici T lenfosit aktivitesinde bozukluk ya da yetersizlik olabileceğini ileri sürmüşlerdir (74).

Behçet sendromu, aralarında kadın olgu hakimiyetinin, diğer otoimmün hastalıklarla birlikteliğin, HLA sınıf II eşliğinin ve klasik bazı otoantikorların (antinükleer antikor [ANA] ve romatoid faktör [RF] gibi) mevcudiyetinin de bulunduğu, birçok karakteristik otoimmün hastalık özelliğini barındırmamaktadır (75). Bununla birlikte, B lenfositlere ait aktivasyon belirleyicilerindeki artış ve kendi antijenlerine özgül bazı antikorların mevcudiyeti, BS'de bir B lenfosit aktivitesinin de bulunabileceğine işaret etmektedir (76). Behçet sendromu olgularına ait serum örneklerinde gösterilmiş olan otoantikorlar arasında endotel hücresi, α-enolaz, α-tropomiyozin, kinektin, selenyum bağlayıcı protein, esteraz-D ve Sip1 spesifitesi gösteren antikorlar mevcuttur (39). Behçet sendromu durumunda yoğun olarak araştırılmış bir diğer olası kendi antijen de HSP60 olarak göze çarpmaktadır. Hayvan modeli olarak sıçanlar seçildiğinde, HSP60'a ait bazı peptit fragmanlarının ve α-tropomiyozinin üveit oluşturduğu çalışmalarda gösterilmiştir (77). Söz konusu otoantikorların önemli bir kısmı oküler BS olgularında belirlenirken, olası patogenetik rolleri halen aydınlatılamamıştır.

2.6. BEHÇET SENDROMU KLİNİĞİ

Behçet sendromu, farklı organ ve organ sistemlerini ilgilendiren sistemik bir enflamatuvar sorun olarak, mukokütan, oküler, vasküler, gastrointestinal sistem, kas-iskelet sistemi ve santral sinir sistemi ile ilişkili yakınma ve bulgulara yol açabilmektedir (78).

Aft olarak da isimlendirilen oral ülserler, BS olgularının %98'inde belirlenmekte ve olguların büyük çoğunluğunda ilk yakınma olarak ortaya çıkmaktadır (79). Behçet sendromu tanısının "olmazsa olmazı" olan oral ülserler, bir bakıma BS'nin "alamet-i farika"sı olarak kabul edilmektedir (80). Ağız içinde, boyutları birkaç milimetre ile bir santimetre arasında değişebilen, yuvarlak ya da oval şekilli, kenarı kırmızı, üstü beyaz bir örtü ile kaplı ve şiddetli ağrılı bu lezyonlar, birden çok olarak da bulunabilirler (79). Önemli nokta, BS'ye ait oral ülserlerin makroskobik ya da mikroskobik olarak, sağlıklı insanların ağzında da gelişebilen aftlardan hiçbir şekilde ayırt edilememesidir. Burada ayırt etmeye yardımcı özellikler, aftların tekrar sayısı ve sıklığı ile eşlik eden diğer yakınma ve bulguların varlığı olarak değerlendirilmektedir (80).

Genital ülserler, BS'li erkek ve kadın olguların dış genital organları üzerinde, oral ülserleri hatırlatacak şekilde ancak onlardan daha derin olarak gelişen ve şiddetli ağrıya neden olan lezyonlardır. Görülme sıklığı, tüm BS'li olguların %80'inde ve fazlasında belirlenerek, oral ülserlerden sonra ikinci sıradadır (79,81). Genital ülserler, hem derinlikleri hem de yerleşim bölgelerinin özellikleri nedeniyle, iyileşmeleri sırasında sonradan da kanıt olarak kullanılabilecek skarlar bırakmaktadır (82).

Behçet sendromu olgularının 1/3 ila 2/3 kadarında, aslında hiçbirisi BS için spesifik olmayan, enflamatuvar özellikte çok sayıda farklı deri lezyonu izlenmektedir. Bunlar arasında eritema nodozum, psödofollikülit, papülopüstüler lezyonlar, akneiform nodüller, piyoderma gangrenozum ve Sweet sendromu benzeri lezyonlar sık görülenleridir (79,81,83).

Benzer şekilde, BS için spesifik olmasa da BS tanı kriteri olarak kullanılan bir başka deri reaksiyonu "Paterji" fenomeni/testidir. Bu test, steril bir iğne ile deri üzerinde oluşturulan temiz ve minör bir delinme/yaralanma bölgesinin, 48 saat sonunda çıplak gözle yapılan değerlendirilmesini içermektedir (84). Paterji fenomeninin temel olarak, non-spesifik travmaya karşı gelişen abartılı bir deri yanıtı ile ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Mikroskobik incelemeler, paterji reaksiyonunun gelişiminde rol oynayan esas hücrelerin

nötrofil lökositler olduğunu ortaya koymuştur (85). Bu bulgu, BS gelişiminde kritik bir rol oynadığı düşünülen nötrofil hiperreaktivitesi ile uyum içinde görülmektedir (44,45).

Göz tutulumu (oküler BS), BS olgularında önemli sakatlık nedeni olabilmektedir. Gerçekten de BS, sık izlendiği coğrafya üzerinde kazanılmış görme kaybının en sık nedeni olarak bildirilmiştir (86). Dikkat çekici bir özellik olarak, BS durumunda paterji pozitifliği ve göz tutulumuna ait sıklık verilerinin coğrafyaya göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (86,87). Göz tutulumu sıklıkla her iki gözde, kronik, ataklarla tekrarlayıcı ve iyi tedavi edilemediği takdirde ilerleyici vasıfta ortaya çıkmaktadır. Behçet sendromu'na ait göz tutulumu karakteristik olarak uveayı (damarsal tabakayı) ilgilendirmekte, olguların bir kısmında ise retinal (sinir tabaka) bir vaskülit de izlenebilmektedir (88).

Behçet sendromu olgularında vasküler tutulum (vasküler BS), değişik serilerde %10-37 civarında bildirilmiştir (89). Farklı boyutlardaki hem arter hem de venleri tutabildiği için BS, tüm vaskülit sendromları içinde özel bir yere sahip olarak görülmektedir (14). Venöz sistemde derin ven trombozu (DVT) BS olgularının en sık belirlenen vasküler lezyonu iken, BS seyrinde ilave olarak, yüzeyel tromboflebit ile visseral (vena kava superior ve inferior, hepatik ve portal venler) ve serebral ven trombozları da izlenebilmektedir (90). Behçet sendromu seyrinde gelişen venöz trombozların diğer nedenlere bağlı olarak gelişen venöz trombozlarla kıyaslandıklarında embolik risklerinin önemli ölçüde düşük olması, BS trombozlarının "sticky" (yapışkan) olarak isimlendirilmelerine neden olmuştur (41,91). Bu dikkat çekici durum, halen patogenetik olarak açıklanmayı beklemektedir. Arteryel sistemde ise BS, aralarında aortun da bulunduğu sistemik arterler ile pulmoner arter ve dallarında darlıklara, trombotik oklüzyonlara ve anevrizma gelişimlerine yol açabilmektedir. Önemli visseral venlerin trombozları ile arter anevrizmalarının rüptürleri BS olgularında mortalite ile sonuçlanabilmektedir (5).

Santral sinir sistemi (SSS) (beyin, beyincik ve omurilik) tutulumu (nöro-Behçet), BS'nin sakatlık ve hayat kaybı riski taşıyan tutulumları arasında yer almaktadır. Belirlenme sıklığı açısından coğrafi farklılıklar gösteren bu BS komplikasyonu Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde daha sık görülmekte ve farklı raporlarda sıklığı %10-30 arasında bildirilmektedir (92). Santral sinir sistemi organlarının parankim alanlarında gelişen lezyonlarla karakterize bu durum, klinikte baş ağrıları, meningoensefalit, kraniyal sinir felçleri, epileptiform bozukluk, hemipleji/parapleji, ataksi ve ekstrapiramidal hareket bozukluğu benzeri tablolara yol açabilmektedir (92).

Behçet sendromu ilişkili gastrointestinal sistem tutulumu (entero-Behçet), literatürde %0-25 oranları ile bildirilmiştir ve dikkat çekici önemli bir özelliği olarak, dünya üzerinde en sık Japonya'da izlenmektedir. Tüm sindirim kanalı boyunca BS'nin en çok tuttuğu anatomik bölge terminal ileum ve çekum olarak belirlenmektedir (93). Tipik olarak, barsak iç yüzeyinde, oral aftları hatırlatan tek ya da çoklu, yuvarlak ya da oval ülserler gelişmekte ve karın ağrısı, barsak kanaması ve çok nadir olmayarak da barsak delinmesi ile sonuçlanabilmektedir (93).

Behçet sendromu kas-iskelet sistemi sorunlarına da yol açabilmekte ve bu başlık altında en sık dizlerde, daha sonra sırasıyla ayak bilekleri, dirsekler ve el bileklerinde, aralıklı, yer değiştiren, tek ekleme ya da asimetrik olarak az sayıdaki (≤4) ekleme ait, sıklıkla sekel/deformite bırakmayan bir artrit oluşturmaktadır (94). Aralarında tarif edilen artritin de bulunduğu kas-iskelet sistemi tutulumlarına ait sıklık, BS için %30-50 arasında olarak bildirilmiştir (95). Artrit durumunda önemli bir mikroskobik bulgu, BS'nin birçok karakteristik lezyonunda dikkat çeken yoğun nötrofilik infiltrasyonun, BS artriti sinovyal dokusunda da belirgin olarak izlenmesidir (96).

Behçet sendromu varlığında izlenebilen ve az sayıda da olsa bildirilerek literatüre girmiş çok nadir tutulumlar arasında, epididimit (erkek olgularda), farklı tipte glomerülonefritler ve amiloid A proteini (AA) amiloidozu (reaktif amiloidoz) yer almaktadır (97).

2.7. BEHÇET SENDROMU'NUN LABORATUVAR BULGULARI

Behçet sendromu için özgül bir laboratuvar bulgusu mevcut değildir (40). Bir başka ifade ile BS'nin laboratuvar tanısı söz konusu değildir. Şiddetli enflamatuvar karakteri nedeniyle BS olgularında, özellikle de alevlenme dönemlerinde, akut faz reaktanları (eritrosit sedimantasyon hızı [ESH], C-reaktif protein [CRP], lökosit sayısı) anormallikleri sık olarak belirlenmektedir. Özgül olmayan bu laboratuvar bulgularının yanında, yukarıda da değinildiği şekilde günümüzde otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmeyen BS durumunda, klasik otoantikorlar (ANA, RF) beklenildiği şekilde negatif olarak tespit edilmektedir.

Klasik BS coğrafyası üzerinde sıklığı hem BS olguları hem de sağlıklı bireyler arasında oldukça yüksek oranda belirlenen HLA-B51 pozitifliği, günümüzde tanısal amaçla kullanılmamaktadır (40).

2.8. BEHÇET SENDROMU'NUN TANI VE AYIRICI TANISI

Tanımlanmasından günümüze kadar geçen sürede BS için, farklı grup ve farklı ülkelerden, sayıları 15'i bulan tanı/sınıflandırma kriterleri bildirilmiştir (98). Her biri farklı özgüllük ve duyarlılık değerlerine sahip bu kriter setleri içinde en yaygın kabul gören ve kullanılanlar, Uluslararası Çalışma Grubu (ISG) (1990) kriterleri (Çizelge 2.1.) ile Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri (ICBD) (2006, 2014 [revize]) olmuştur (Çizelge 2.2.) (80,98,99).

Çizelge 2.1. Uluslararası Çalışma Grubu Behçet hastalığı tanı kriterleri[1, 2]

Bulgu/Kriter	Açıklama
Tekrarlayıcı oral ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen ve 12 aylık bir süre içinde en az 3 kez tekrar eden minör aftöz, majör aftöz ya da herpetiform ülserler
Tekrarlayıcı genital ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen aftöz ülserasyon ya da skar varlığı
Deri lezyonları	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen eritema nodozum, psödofollikülit ya da papülopüstüler lezyonlar; ya da kortikosteroid tedavisi almayan adölesans sonrası hastalarda Hekim tarafından tespit edilen akneiform nodüller
Göz lezyonları	Anterior üveit, posterior üveit ya da biomikroskop ile incelemede vitreus içinde hücre varlığı; ya da oftalmolog tarafından tespit edilen retinal vaskülit
Pozitif paterji testi	24.-48. saatlerde Hekim tarafından okunan

[1] ISG (80).
[2] Behçet sendromu tanısı için, tekrarlayıcı oral ülserlere ilave olarak diğer 4 bulgu/kriterden en az 2 tanesinin varlığı gereklidir.

Çizelge 2.2. Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri[1, 2]

Bulgu/Kriter	Puan
Oral aftöz ülserler	2
Genital aftöz ülserler	2
Oküler lezyonlar (anterior üveit, posterior üveit, retinal vaskülit)	2
Deri lezyonları (psödofollikülit, eritema nodozum)	1
Vasküler lezyonlar (yüzeyel tromboflebit, derin ven trombozu, visseral ven trombozu, arter trombozu ya da anevrizması)	1
Paterji testi[3]	1
Nörolojik tutulum	1

[1] ICBD (99).
[2] Behçet sendromu tanısı için ≥4 puan gereklidir.
[3] Paterji testi uygulanması zorunlu değildir, pozitif oluşu tanıyı destekler.

Behçet sendromu ayırıcı tanısı, aralarında idiyopatik oral aftöz ülserleri (tekrarlayıcı aftöz stomatit), enflamatuvar barsak hastalıklarını, seronegatif spondiloartropati grubu hastalıkları, ülserlerle seyreden cinsel yolla bulaşan hastalıkları, nötrofilik dermatozlar grubunda yer alan sorunları, vaskülitik sendromları, farklı üveit formlarını ve multipl sklerozu barındıran, geniş bir yelpaze üzerindeki çok sayıda sorunu içermektedir (40).

2.9. BEHÇET SENDROMU'NUN TEDAVİSİ

Behçet sendromu'nun tedavisi için günümüzde standart tek bir yaklaşım kullanılmamakta ve BS olguları klinik özellikleri dikkate alınarak farklı şemalarla tedavi edilmektedir (40,100). Olguların büyük çoğunluğunda belirlenen ve ön plandaki yakınma/bulguları oluşturan deri ve mukoza lezyonları için esas olarak kolşisin, bölgesel/lezyon içi glukokortikoidler, dapson, talidomid, veya levamizol kullanımı önerilmektedir (79). Glukokortikoidler özgül olmayan ve güçlü bir immünosupresif etkiye sahipken, diğer 4 ajan, esas olarak immünomodülatör etkiler göstermektedir. Yukarıda sıralanan ve ilk basamakta tercih edilen bu ajanlara dirençli olgular durumunda ise metotreksat (immünosupresif) ya da interferon (immünomodülatör) tedavileri kullanılabilmektedir (101).

Organ fonksiyonlarını (örneğin, görme) ve/veya hayatı (örneğin, beyin, majör damar) tehdit eden BS tutulumları durumunda klasik tedavi yaklaşımı, diğer tüm ciddi seyirli sistemik vaskülitlerde olduğu gibi, yüksek doz glukokortikoidlerle birlikte güçlü etkili immünosupresif ajan (azatiyoprin, siklosporin, klorambusil, siklofosfamid, metotreksat veya takrolimus) kombinasyonunu içermektedir. İnterferon tedavisinin de özellikle oküler BS'de görme fonksiyonunu korumada etkili olduğu gösterilmiştir (102). Güncel çalışmalar, henüz bir tedavi standardı haline gelmiş olmasalar da TNF-α, IL-1 ve IL-6 antagonisti ajanların, konvansiyonel tedavi şemalarına dirençli ciddi BS olgularında tedavi değeri taşıyabildiklerine işaret etmektedir (100,103).

Behçet sendromu'nun öne sürülmüş etiyopatogenetik açıklamalarından birisi olan olası streptokok enfeksiyonu varlığı ile ilişkili olarak dikkat çeken, ancak yaygın kabul ve kullanım sahası bulmamış bir başka tedavi yaklaşımı ise BS'de antibiyotiklerin kullanılmasıdır (104,105). Bu başlık altında, literatürde kullanıldığı belirlenen antibiyotikler arasında benzatin penisilin ve minosiklin, ilk iki sırayı almaktadır (104,105).

Üzerinde tartışmaların halen sürdüğü bir diğer önemli tedavi başlığı ise, BS seyrinde gelişebilen venöz/arteriyel trombotik damar tutulumlarında antikoagülan tedavi kullanımına ihtiyaç olup olmadığıdır. Genel kabul, trombotik damar tutulumunun bulunduğu tüm BS olgularına etkin bir immünosupresif tedavi başlanması; bu immünosupresif tedaviye, serebral ve hepatik ven trombozlarında antikoagülan ajan

eklenirken, diğer venöz trombozlarda, tablo tekrarlayıcı/ilerleyici de olsa antikoagülasyon kullanılmaması yönündedir (106,107).

Behçet sendromu durumunda cerrahi yaklaşım, aralarında yırtılma riski taşıyan sistemik arter anevrizmalarının, koruyucu metotlarla kanama kontrolünün sağlanamadığı pulmoner arter anevrizma kanamalarının ve perforasyon/penetrasyonla komplike olmuş barsak tutulumunun yer aldığı endikasyonlar durumunda kullanılmaktadır (108).

2.10. BEHÇET SENDROMU'NUN PROGNOZU

Behçet sendromu şiddetli hastalık seyrinin esas olarak genç erkek olgularda belirlendiği iyi bilinmektedir (5). Neden olduğu çok sayıda önemli morbidite/sakatlık ile birlikte BS'nin, %10'a kadar ulaşabilen bir 20 yıllık mortaliteye sahip olduğu da bildirilmiştir (5). Behçet sendromu olgularında mortalitenin esas nedenleri, santral sinir sistemi, majör vasküler, pulmoner arter, barsak ve nadir de olsa kalp tutulumları şeklinde sıralanabilir (5,6,8).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Behçet sendromu ülkemiz için önem taşıyan bir sağlık sorunudur. Azizlerli ve arkadaşları İstanbul'da BS prevalansını inceledikleri çalışmalarında, 100.000 adölesan/erişkin bireyde 421 olguluk bir prevalans değeri belirlemişlerdir (3). Bu BS ile ilgili literatürde yer alan en yüksek prevalans değerlerinden birisidir (40,109). Ülkemizdeki yüksek görülme sıklığı dışında BS, çeşitli ciddi sakatlıklara ve hayat kaybına da neden olmaktadır (5–8). Oküler tutuluma bağlı ilerleyici ve kalıcı görme kaybı, vasküler tutulum sonucu gelişebilen şiddetli venöz yetmezlik ve SSS tutulumuna ikincil nörolojik kayıplar, BS olgularında önemli fonksiyon kayıpları ve sakatlıklar ortaya çıkarmaktadır. Özellikle genç erkek olgular durumunda geçerli olan kısalmış yaşam beklentisi ve artmış mortalite de BS'de korkulan sonlanımlar arasında yer almaktadır (40,110). Seyahi ve arkadaşları, 286'sı erkek ve 142'si kadın toplam 428 BS olgusunu ortalama 20 yıl süreyle takip ettikleri çalışmalarında, 42 (%10) adet mortalite (39 erkek ve 3 kadın) bildirmişlerdir (5). Bu çalışmada en önemli mortalite nedenleri, büyük damar ve santral sinir sistemi tutulumları olarak belirlenmiştir (5).

Günümüzde BS tanısı klinik yakınma ve bulgulara dayalı olarak konulmakta ve sendrom için özgül bir laboratuvar bulgusu ya da biyolojik belirleyici bulunmamaktadır (40,111). Bu durumu daha da karmaşık bir hale getirmek üzere, BS kliniği coğrafyalar ve etnik gruplar arasında farklılıklar göstermekte, olgular klinik özelliklerine göre farklı öbeklerde toplanabilmekte ve immünopatogenezle ilgili çalışmalar, ortak ve tutarlı bulgular yerine, farklı ve zaman zaman da birbirleriyle çelişen sonuçlar vermektedir. Söz konusu tüm bu özellikler, BS'nin tek bir hastalık antitesi olmaktan çok, farklı hastalık yolaklarıyla gelişen ve ortak/benzer klinik yakınma ve bulgulara sebebiyet veren bir sendrom olması ihtimalini güçlendirmektedir (10,16). Oğuz ve arkadaşları, literatürde yer alarak "Gene Expression Omnibus" (GEO) veri tabanına yüklenmiş olan Portekiz BS verisi üzerinde gerçekleştirdikleri genom boyu ifade çalışmalarında, mukokütan, oküler ve vasküler BS grupları arasında çarpıcı gen ifade ve hastalık yolakları farklılıkları bulunduğunu ortaya koymuşlardır (10). Moleküler düzeyde dokümante edilen bu farklılıklar önemli sonuçlar doğuracak güç ve nitelikte görülmektedir. İlk ve belki de en önemli sonuç, gelecekte planlanacak olan BS çalışmalarında, klinikte ortak bir tanı alan BS olgularının tek bir hasta grubu olarak bir arada incelenmeleri yerine, klinik özelliklerine göre oluşturulan farklı öbeklerde incelenmelerinin doğru olacağıdır (10). İkinci bir önemli sonuç, günümüzde sayıları gittikçe artan ve klinikte giderek daha yüksek başarıyla kullanılan hedefe yönelik

moleküler tedavi ajanlarıyla ilgili olarak, BS için, her olguda etkili olabilecek tek bir ajanın geliştirilmesinin muhtemelen kolay olmayacağı öngörüsüdür. Son olarak, akla gelen diğer bir önemli sonuç ise, BS klinik özellikleri coğrafyalar arasında önemli farklılıklar gösterirken ve homojen sayılabilecek tek bir popülasyonda (Portekiz örneği) dahi BS olguları arasında dikkat çekici farklılıklar belirlenirken, değişik etnik gruplar arasında BS hastalık yolakları açısından belirgin farklılıklar bulunuyor olabileceği ihtimalidir.

Bu çalışmada, Türk BS olguları ile uyumlu seçilmiş sağlıklı kontrol grubunda genom boyu ifade analizi gerçekleştirilerek, [1] BS alt grupları ile kontrol grubu arasındaki ve BS alt gruplarının kendi aralarındaki karşılaştırmalarla farklı ifadeye sahip gen setlerinin ortaya konması, [2] bu gen setlerinden yola çıkarak BS alt grupları için ayırt edici moleküler "imza"ların tanımlanması ve [3] yine bu gen setlerinin gen ontoloji analizleri ile değerlendirilmeleri hedeflenmiştir. Böylece, Türk BS olgularında olası moleküler hastalık mekanizmalarının ortaya konması ve imkan dahilinde olursa, moleküler tedavi hedefi olarak değer taşıyabilecek genlere ulaşılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. ETİK KURUL ONAYI, ÇALIŞMAYA KATILAN MERKEZLER VE BEHÇET SENDROMLU OLGULAR İLE KONTROL GRUBU BİREYLERİNİN SEÇİLMESİ

Çalışma, Ufuk Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 24.06.2009 tarih ve 08065 karar numarası ile etik kurul onayı almış ve ilgili Etik Kurul Değerlendirme Formu EK 1'de sunulmuştur.

Çalışmaya dahil edilen BS'li olgular, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Romatoloji Kliniği polikliniklerine olağan kontrolleri için başvurmuş olan, ISG tarafından önerilen tanı kriterlerine uygun olarak Behçet hastalığı tanısı olan ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden olgulardan oluşmuştur (80). Uluslararası Çalışma Grubu tarafından önerilen söz konusu tanı kriterleri Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Uluslararası Çalışma Grubu tarafından geliştirilen Behçet hastalığı tanı kriterleri[1]

Tekrarlayıcı oral ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen ve 12 aylık bir süre içinde en az 3 kez tekrar eden minör aftöz, majör aftöz ya da herpetiform ülserler
İlave olarak aşağıdakilerden 2 tanesi:	
Tekrarlayıcı genital ülserler	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen aftöz ülserasyon ya da skar varlığı
Göz lezyonları	Anterior üveit, posterior üveit ya da biomikroskop ile incelemede vitreus içinde hücre varlığı; ya da oftalmolog tarafından tespit edilen retinal vaskülit
Deri lezyonları	Hekim ya da hasta tarafından tespit edilen eritema nodozum, psödofollikülit ya da papülopüstüler lezyonlar; ya da kortikosteroid tedavisi almayan adölesans sonrası hastalarda Hekim tarafından tespit edilen akneiform nodüller
Pozitif paterji testi	24.-48. saatlerde Hekim tarafından okunan

[1] ISG (80).

Çalışmada yer alan sağlıklı kontrol grubu bireyleri, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Periyodik Sağlık Kontrolü ("check up") polikliniğine başvurmuş olan, herhangi bir sağlık sorunu olmayan, kendisinde ya da ailesinde BS öyküsü bulunmayan ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden kişiler arasından, BS grubuna yaş ve cinsiyet açısından uyumlu olacak şekilde seçilmiştir.

4.2. BEHÇET SENDROMLU OLGULAR İLE KONTROL GRUBU BİREYLERİNİN KLİNİK BİLGİ VE KAN ÖRNEKLERİNİN TEMİNİ

Çalışmaya dahil edilen BS olguları ile sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait klinik bilgiler, EK 2'de yer alan Olgu Rapor Formu ile toplanmıştır.

Behçet sendromlu olguların ve kontrol grubu bireylerinin kan örnekleri, PAXgene® Kan RNA Tüpü (PreAnalytiX®, Catalog no: 762165, Switzerland) kullanılarak alınmıştır. Bu tüpler tamamen özel olarak, tam kan örneklerinde hücre içi RNA'nın stabilizasyonu ve izleyecek RNA saflaştırma işlemleri için tasarlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm BS olguları ile kontrol grubu bireylerinden, birisi çalışmada kullanılmak üzere, diğeri ise tedbir amaçlı ve ihtiyaç olursa değerlendirmek üzere toplam iki adet/tüp örnek alınmıştır. Alınan örnekler, üretici firma protokolüne uygun olarak, ilk 24 saat oda sıcaklığında, izleyen 24 saat süresince -20°C sıcaklıkta ve takiben de çalışılacakları güne kadar -80°C sıcaklıkta korunmuşlardır (PAXgene® Blood RNA - BD Catalog).

4.3. BEHÇET SENDROMU ALT GRUPLARININ TANIMLANMASI

Çalışmada yer alan BS olguları, bireysel klinik özelliklerine ve Çizelge 4.2.'de gösterilen kriterlere uygun şekilde, mukokütan BS (M), oküler BS (O), vasküler BS (V) ve diğer BS (D) olarak 4 alt gruba ayrılmıştır (10,16,112–115).

Çizelge 4.2. Behçet sendromu alt gruplarına ait kriterler

Behçet Sendromu Alt Grubu	Tanımlayıcı Klinik Özellikler
Mukokütan	Sadece oral ülser ile birlikte genital ülser ve/veya deri lezyonları ve/veya paterji testi pozitifliği (izole olarak mukokütan bulgular) mevcut
Oküler	Mukokütan bulgulara ilave olarak, farklı klinik şekilleriyle ortaya çıkabilen oküler tutulum mevcut
Vasküler	Mukokütan bulgulara ilave olarak, oküler tutulum olmadan, farklı klinik şekilleriyle ortaya çıkabilen vasküler tutulum mevcut
Diğer	Mukokütan bulgulara ilave olarak, oküler tutulum ve/veya vasküler tutulum ve/veya kas-iskelet sistemi tutulumu ve/veya gastrointestinal sistem tutulumu ve/veya sinir sistemi tutulumu mevcut

4.4. TEMEL DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERE AİT İSTATİSTİK ANALİZLER

Çalışmaya ait temel demografik özellik verilerinin normal dağılım göstermemesi nedeniyle, merkezi eğilim ölçüsü olarak ortanca (medyan) ile birlikte minimum ve maksimum değerler, iki bağımsız grup ortalamasının karşılaştırılması amacıyla Mann-

Whitney U testi ve iki bağımsız gruba ait oranların karşılaştırılması için ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Analizlere ait *p* değerleri mutlak sayısal değerleri ile gösterilmiş ve $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistik analizler, "SPSS for Windows, Version 16.0" yazılımı (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

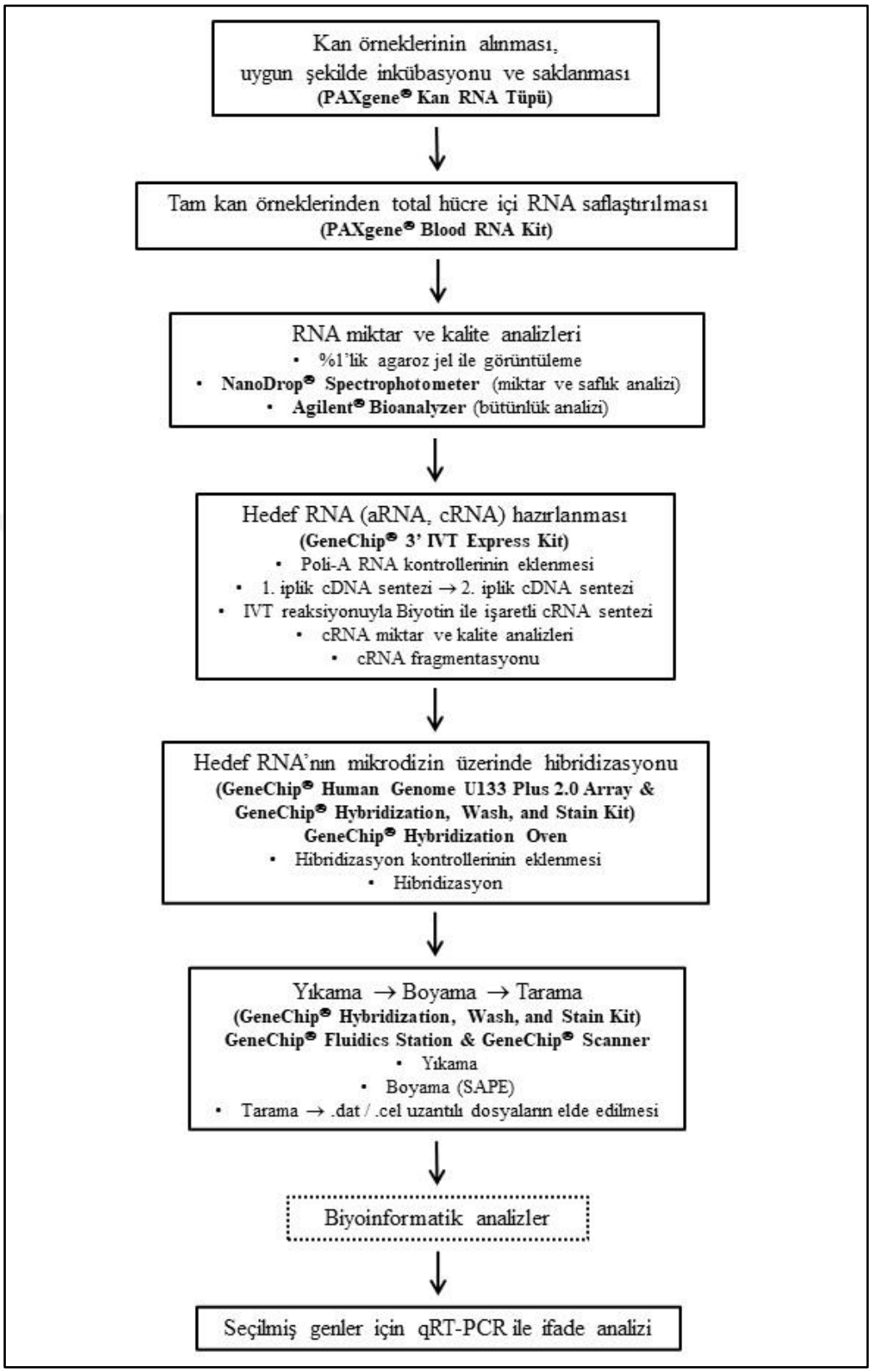
4.5. TAM KAN ÖRNEKLERİNDEN RNA İZOLASYONU

Çalışmaya ait in vitro deneyleri özetleyen akış şeması Şekil 4.1.'de yer almaktadır.

Çalışma için toplanarak -80°C sıcaklıkta muhafaza edilen kan örneklerinden RNA saflaştırması, "PAXgene® Blood RNA Kit" (PreAnalytiX®, Catalog no: 762174, Switzerland) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firma protokolüne uygun olarak, RNA saflaştırma işlemi öncesinde -80°C sıcaklıktan çıkarılan tüplerin önce oda sıcaklığına dengelenmeleri ve sonra da ilave olarak 2 saat daha oda sıcaklığında tutulmaları sağlanmıştır. İzleyen RNA saflaştırma işleminin tüm basamakları, hiçbir değişiklik yapılmadan, PAXgene® Blood RNA Kit El Kitabı'nda yer aldığı şekliyle, üretici firmanın tarif ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir (PAXgene® Blood RNA Kit El Kitabı). Elde edilen saflaştırılmış RNA'dan, stok olarak ve miktar/kalite analizleri için ayrılan örnekler dışında, çalışmanın bir sonraki basamağı için ihtiyaç duyulan 500 ng miktarındaki örnekler -80°C sıcaklıkta muhafazaya alınmıştır.

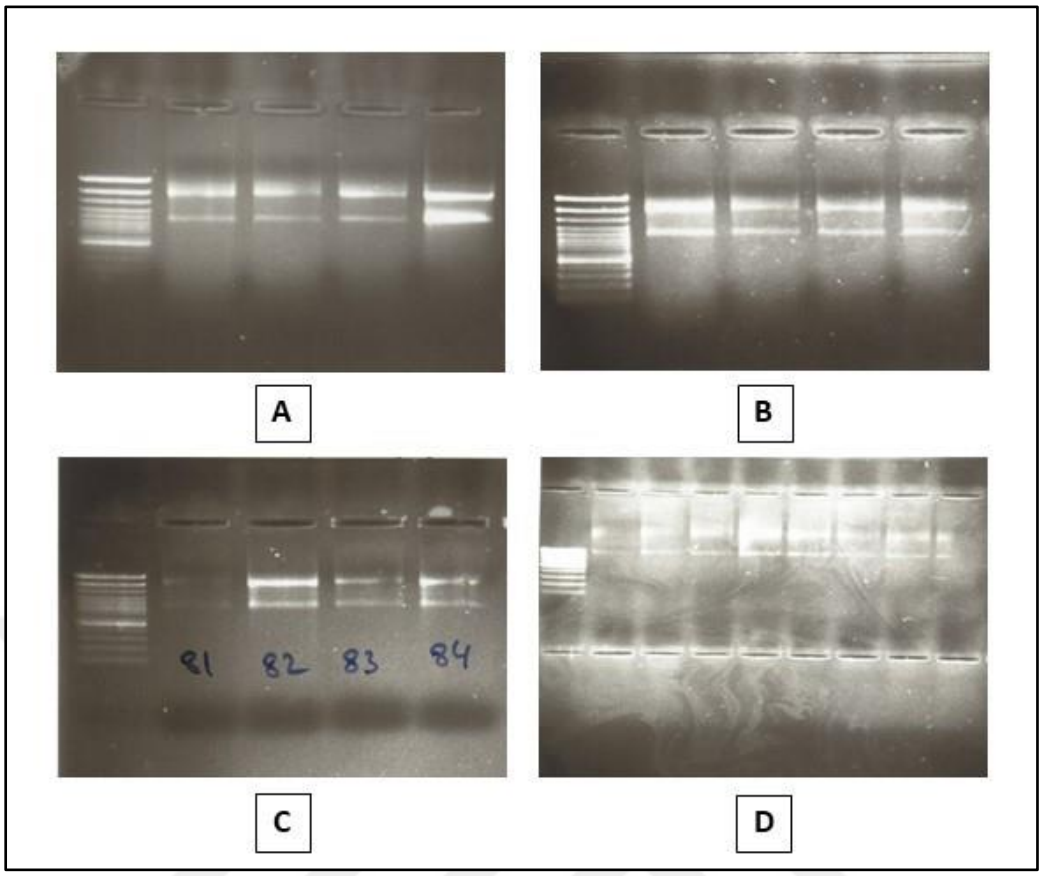
4.6. RNA MİKTAR VE KALİTE ANALİZLERİ

Tam kandan izole edilen RNA örnekleri, sırasıyla %1'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülenerek, nano-spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop® 2000/2000c Spectrophotometer, U.S.A.) ile A_{260} ve A_{280} ölçümleri gerçekleştirilerek ve otomatize elektroforez cihazı (Agilent® 2100 Bioanalyzer, Germany) ile incelenip RNA Bütünlük Sayısı (RIN) değerleri hesaplanarak miktar ve kalite analizlerine tabi tutuldular. Nano-spektrofotometrik ve otomatize elektroforetik değerlendirmeler için, üretici firmalar tarafından tanımlanan protokoller hiçbir değişiklik yapılmadan aynı şekilde kullanılmıştır (Thermo Scientific NanoDrop® 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual, Agilent® RNA 6000 Nano Kit Guide). Toplam 20 adet RNA örneğine ait %1'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Saflaştırılan RNA örneklerine ait konsantrasyonlar, A_{260}/A_{280} oranları ve RIN değerleri ise EK 3'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Çalışmanın in vitro deneylerini özetleyen akış şeması

aRNA, amplifiye olmuş RNA ("amplified RNA"); cDNA, komplementer DNA; cRNA, komplementer RNA; IVT, *in vitro* transkripsiyon; qRT-PCR, eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu; SAPE, streptavidin-R-fikoeritrin.

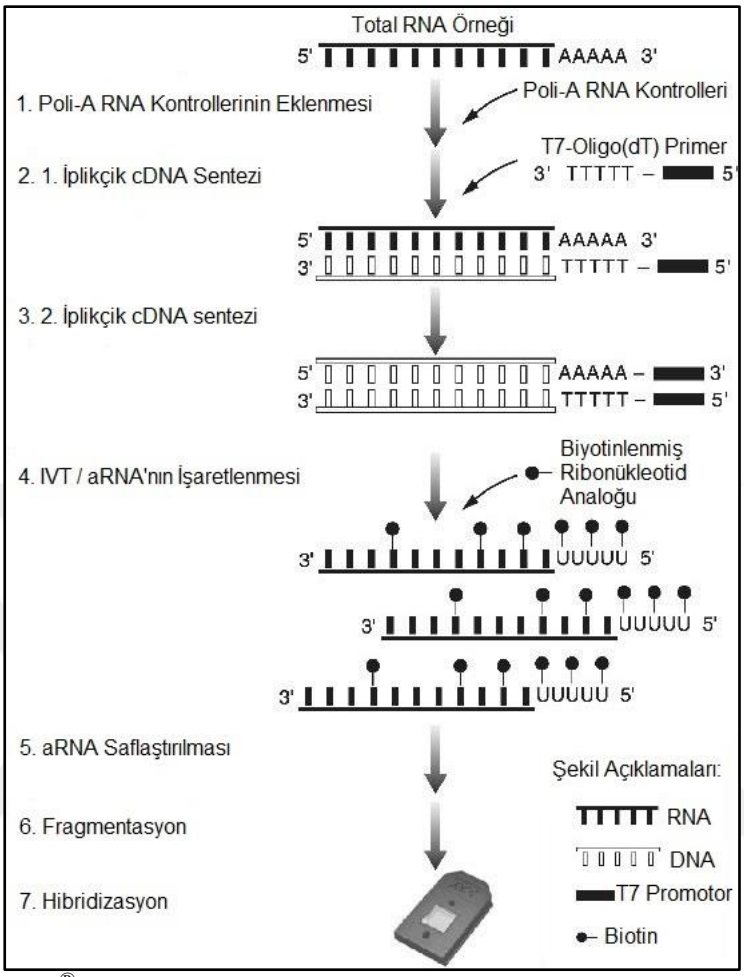


Şekil 4.2. Seçilmiş 20 adet RNA örneğine ait agaroz jel görüntüleri (**A**. Soldan sağa "Ladder", M2, B2, B1, B3. **B**. Soldan sağa "Ladder", V8, M4, M5, B4. **C**. Soldan sağa "Ladder", V9, B5, B6, B7. **D**. Soldan sağa "Ladder", M6, M7, V4, V7, M8, O5, C9, C11.)

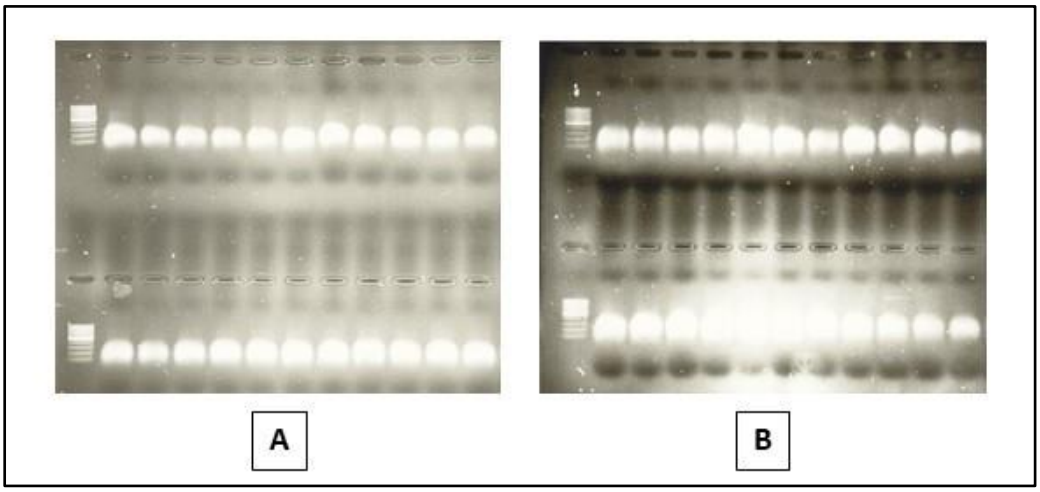
4.7. BİYOTİNLE İŞARETLENMİŞ VE FRAGMENTE EDİLMİŞ HEDEF RNA HAZIRLANMASI

Mikrodizin üzerinde hibridizasyon basamağından önce, hedef RNA amplifiye edilerek biyotinle işaretlenmiş ve çalışma duyarlılığını arttırarak optimal sonuçları elde etmek üzere fragmente edilmiştir. Çalışmanın bu basamağına, önceki benzer protokollü çalışmaların optimizasyon deneylerinde kazanılan tecrübelerin gösterdiği şekilde, 500 ng miktarındaki RNA örnekleriyle başlanmıştır. Protokolüne ait şematik gösterimin Şekil 4.3.'de yer aldığı bu çalışma basamağı, "GeneChip® 3' IVT Express Kit" (GeneChip®, Catalog no: 901229, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve üretici firma tarafından önerilen protokol, hiçbir değişiklik yapılmadan aynı şekilde kullanılmıştır (GeneChip® 3' IVT Express Kit User Manual). İn vitro transkripsiyon ile amplifiye edilerek biyotinle işaretlenen RNA (aRNA), nano-spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop® 2000/2000c Spectrophotometer, U.S.A.) ile miktar ve saflık açısından değerlendirilmiş ve ardından da fragmente edilerek, %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Amplifiye edilmiş RNA örneklerine ait

konsantrasyonlar ve A_{260}/A_{280} oranları EK 3'de gösterilirken, fragmentasyon sonrasına ait jel görüntüleri Şekil 4.4.'de yer almaktadır.



Şekil 4.3. "GeneChip® 3' IVT Express Kit" protokolünün şematik gösterimi



Şekil 4.4. Çalışmaya ait 44 adet amplifiye edilmiş RNA örneğinin fragmentasyon işlemi sonrasındaki jel görüntüleri

4.8. HİBRİDİZASYON

Mikrodizin teknolojisi kullanılarak genom boyu ifade analizi karşılaştırmalarının yapıldığı bu çalışmada, "GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0" (Applied Biosystems®, Catalog no: 900466, U.S.A.) mikrodizinleri kullanılmıştır. Söz konusu mikrodizin, ürün bilgi sayfasında da ifade edildiği gibi, insan genomunda yer alan ve iyi düzeyde tanımlanmış 38.500 adet genin de aralarında bulunduğu 47.000'den fazla transkript ve varyantı temsil etmektedir (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array Product Information Sheet). "GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0" mikrodizini, "GeneChip® Human Genome Arrays" platformundaki en kapsamlı mikrodizin olarak sunulmaktadır.

Biyotinle işaretlenerek amplifiye edilen ve 15 μg miktarıyla fragmentasyona alınan hedef RNA örnekleri, "GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit" (Applied Biosystems®, Catalog no: 900720, U.S.A.) kullanılarak ve üretici firma tarafından önerilen protokole harfiyen uyularak, mikrodizinlere yüklenmiştir (GeneChip® Expression Analysis Technical Manual). Yükleme işlemi tamamlanan mikrodizinler, "GeneChip® Hybridization Oven" (Applied Biosystems®, Catalog no: 00-0331, U.S.A.) içinde, 45°C sıcaklık ve 60 rpm (dakikadaki devir sayısı) dönüş hızında 16 saat süreyle hibridizasyona alınmıştır.

4.9. MİKRODİZİNLERİN YIKANMA, BOYANMA VE TARANMASI

Hibridizasyon basamağı tamamlanan mikrodizinler, yıkama ve boyama protokollerinin gerçekleştirileceği "GeneChip® Fluidics Station 450" (Applied Biosystems®, Catalog no: 00-0079, U.S.A.) cihazına yüklenerek ve yine "GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit" (Applied Biosystems®, Catalog no: 900720, U.S.A.) içinde yer alan ilgili bileşenler kullanılarak, yıkama ve boyama işlemlerine tabi tutulmuştur. Üretici firma tarafından önerilen protokol, bu basamak için de hiçbir değişiklik yapılmadan aynı şekilde uygulanmıştır (GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Guide). Söz konusu yıkama işlemleri istenen bağlanma reaksiyonlarını olumsuz etkileyebilecek artık molekülleri ortamdan uzaklaştırırken, biyotin spesifik streptavidin-R-fikoeritrin (SAPE) bağlanması ve oluşan bu sinyali amplifiye etmeye yönelik izleyen bağlanmalar, son basamakta gerçekleştirilecek olan konfokal lazer taraması öncesinde, mikrodizin temelli analizlerin başarısı için büyük önem taşımaktadır.

Yıkanma ve boyanma işlemlerini takiben mikrodizinler, "GeneChip® Scanner 3000" (Applied Biosystems®, Catalog no: 00-0186, U.S.A.) cihazında, "Command Console® 4.0 Software" (AGCC) yazılımı kullanılarak ve üretici firma protokolü harfiyen takip edilerek taranmışlardır (GeneChip® Expression Wash, Stain and Scan User Guide). Tarama işleminin tamamlanması ile AGCC yazılımı, *.exp*, *.chp* ve *.rpt* uzantılı dosyalarla birlikte *.dat* ve *.cel* uzantılı dosyaları oluşturmaktadır. Bu dosyalardan *.dat* uzantılı dosya taranmış olan mikrodizine ait görüntüyü saklarken, *.cel* uzantılı dosya ise, kafes ("grid") ile tanımlanan her bir prob setine ait ışık şiddeti (parlaklık) değerlerini içermektedir. İzleyen biyoinformatik analizler için elde edilmiş olan ham *.cel* dosyaları kullanılmıştır.

4.10. SEÇİLMİŞ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ İÇİN QRT-PCR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN GEÇERLİ KILMA DENEYLERİ

Hibridizasyon bazlı bir metodoloji ve mikrodizinler kullanılan bu ifade çalışmasının geçerli kılma (validasyon) deneyleri, eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Çizelge 4.3.'de ilk sütunda yer alan ilk 12 gen, sınıf karşılaştırmalarında belirlenen kat değişimi (FC) değerleri ve olası moleküler yolaklardaki önemleri dikkate alınarak seçilmiştir. Söz konusu genler için FC değerinin mümkün olduğunca ≥3 (artış ya da azalış yönünde) olmasına özen gösterilmiştir. İlgili literatüre dayanarak, "housekeeping" ("hizmetçi") gen olarak da Peptidilprolil İzomeraz B (*PPIB*) seçilmiştir (116).

Geçerli kılma deneyleri, mukokütan BS, vasküler BS ve sağlıklı kontrol grubundan seçilen 10'ar örnek, her biri 3'lüler olarak çalışılarak, "LightCycler® 480" (Roche Applied Science, Catalog no: 05 015 278 001, Germany) cihazında gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan "RealTime Ready® Catalog Assays" (Roche Applied Science, Catalog no: 05 532 957 001, Germany) primerlerine ait detaylar Çizelge 4.3.'de yer almaktadır (RealTime® Ready Catalog Assays). Reaksiyon ortamının hazırlanması amacıyla "LightCycler® 480 Probes Master" (Roche Applied Science, Catalog no: 04 707 494 001, Germany) kullanılmış ve tüm reaksiyon kurulumu, üretici firma tarafından önerilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (LightCycler® 480 Probes Master).

Geçerli kılma deneylerinin tamamlanmasını takiben, ifade seviyelerinin hesaplanması için $2^{(-\text{Delta Delta C(T)})}$ metodu kullanılmıştır (117).

Çizelge 4.3. Geçerli kılma deneyleri için seçilen genler ve ilgili polimeraz zincir reaksiyonu primerlerine ait detaylar[1]

Gen	Primer	Dizi	Uzunluk	Tm	%GC	Pozisyon	Amplikon Uzunluğu
IFI27	Sol	gtgttccacaggtcctctcc	20	59	60	420-439	75
	Sağ	ctcagtggtagatagacccttcc	24	59	50	471-494	
RSAD2	Sol	tctgcaatactatcccgttgg	21	59	48	1285-1305	63
	Sağ	ccacgtgcagcagaaaatc	19	60	53	1329-1347	
IFI44L	Sol	tgctaaggagtatagcagatgaccta	26	59	42	4468-4493	77
	Sağ	ccacaacatcactctcactttaaga	25	59	40	4520-4544	
CLEC12A	Sol	tttggggaaaaagcacctc	19	60	47	171-189	78
	Sağ	cagaaggcacagaagagtcaga	22	59	50	227-248	
ARG1	Sol	caaggtggcagaagtcaaga	20	59	50	349-368	76
	Sağ	gcttccaattgccaaactgt	20	60	45	405-424	
DEFA4	Sol	actccaggcaagaggtgatg	20	60	55	188-207	71
	Sağ	aaatagatatgtcctggtcttctgg	25	59	40	234-258	
MS4A1	Sol	aaaaacagcatagcttatacatggac	26	59	35	1644-1669	65
	Sağ	gcctagagtgggagttaggaaaa	23	60	48	1686-1708	
IGHM	Sol	acaggacttccttcccgact	20	60	55	90-109	69
	Sağ	gtgctgctgatgtcagagttg	21	59	52	138-158	
TUBB2A	Sol	aaatatgtacctcgggccatc	21	60	48	235-255	66
	Sağ	tccagacctgacagagtcca	20	59	55	281-300	
ORM1	Sol	tcgtgtacaccgattggaaa	20	59	45	596-615	101
	Sağ	ggctgtgtcctgctaggatt	20	59	55	677-696	
IFIT1	Sol	tggcatgcacctgtagctt	19	60	53	2948-2966	64
	Sağ	gctccagcagtccactcac	19	59	63	2993-3011	
CMPK2	Sol	agcatgttgtgtggcagaaa	20	60	45	1449-1468	67
	Sağ	aagagggtacgatggctgaa	20	59	50	1496-1515	
PPIB	Sol	tctccgaacgcaacatga	18	59	50	230-247	109
	Sağ	ggccccttcttcttctcatc	20	60	55	319-338	

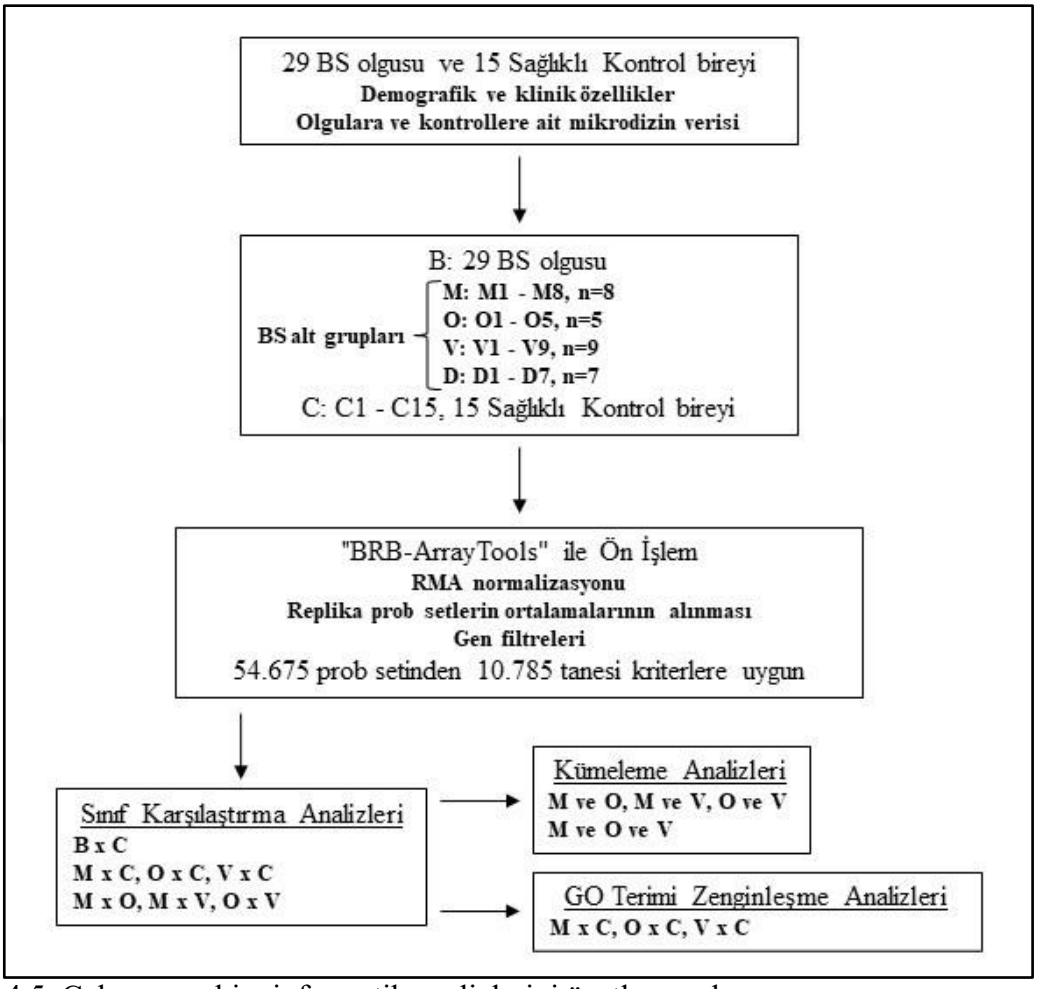
[1] Peptidilprolil İzomeraz B (*PPIB*) "hizmetçi" gen olarak seçilmiştir.
%GC, guanin sitozin yüzdesi; Tm, erime sıcaklığı.

4.11. MİKRODİZİN VERİSİ ÜZERİNDEKİ ÖN İŞLEM BASAMAKLARI

Çalışmanın biyoinformatik analizlerine ait akış şeması Şekil 4.5.'de yer almaktadır.

Transkriptomik düzeydeki ölçümler kesin olarak belirlenmeden ve esas biyoinformatik analizlere başlanmadan önce mikrodizin verisinin ön işlemesi, Dr. Richard Simon ve "BRB-ArrayTools" Geliştirme Ekibi tarafından yazılmış olan "BRB-ArrayTools v4.4.1" Kararlı Sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (*https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/*). Öncelikle, henüz ham ve her biri ayrı ayrı *.cel* dosyaları şeklinde hazır bulunan mikrodizin verileri, "BRB-ArrayTools" yazılımının veri içeri aktarma fonksiyonu kullanılarak harmanlanmıştır. Harmanlanmış bir şekilde içeri aktarılan mikrodizin verisinin normalizasyon işlemi, [1] zemin (arka plan) düzeltmesini, [2] iki tabanlı logaritmik dönüşümü ve [3] kuantil normalizasyonu içeren "Robust Multiarray Average" (RMA) algoritması kullanılarak tamamlanmıştır (118). Normalizasyonu takiben, her bir mikrodizin üzerindeki tekrar eden (replika) prob setlerine ait ölçümlerin ortalamaları alınmış ve son olarak da bir gene ait ifade verisinin örneklerin %50'den fazlasında eksik bulunması ya da bir gene ait ifade verisinin bütün örneklerin ancak %20'sinden azında o genin ortanca ifade

değerine göre her iki yönden birinde (artış ya da azalış) en az 1,5'lik bir kat değişimine sahip olması durumunda geçerli olacak ve bu özellikleri taşıyan genleri tümüyle çalışmadan dışlayacak gen filtreleri uygulanmıştır.



Şekil 4.5. Çalışmanın biyoinformatik analizlerini özetleyen akış şeması

B, tüm Behçet sendromu olgularını içeren grup; BS, Behçet sendromu; C, kontrol grubu; D, diğer Behçet sendromlu olguların grubu; GO, gen ontolojisi; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; RMA, "Robust Multiarray Avarage"; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

4.12. GEN İFADE VERİLERİNİN ANALİZİ

Behçet sendromu alt gruplarının sağlıklı kontrol grubu ile ve kendi aralarındaki sınıf karşılaştırma analizleri, "BRB-ArrayTools v4.4.1" yazılımı kullanılarak yapılmıştır (*https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/*). İki grup arasındaki sınıf karşılaştırma analizleri sırasında rastgele varyans modelli iki örneklem t-testi uygulanmış ve farklı ifadeye sahip genlerin belirlenmesi için *p* değeri ≤0,05 ve FC değerleri sırasıyla ≥1,5 ve ≥2 olarak seçilmiştir. Sınıf karşılaştırmalarına ait bulguların Venn diyagramı ile gösterimi ve eşlik

eden analizleri ise Juan Carlos Oliveros tarafından geliştirilen "Venny 2.1.0" ile gerçekleştirilmiştir (*https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/*).

Behçet sendromu olgularının kümeleme analizleri için, "BRB-ArrayTools" yazılımının yerleşik kümeleme araçları ile "Cluster 3.0" ve "TreeView" yazılımları kullanılmıştır (*http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm#ctv*) (119). Kümeleme analizleri sırasında hem olgular hem de genler birlikte kümelenmiş ve Öklid mesafe metriği ve ortalama bağlantı kullanan hiyerarşik bir kümeleme algoritması uygulanmıştır. Kümeleme analizleri için kullanılan genler, M x O, M x V, O x V (her üçü için de iki örneklem t-testi) ve M x O x V (ANOVA) sınıf karşılaştırmaları sırasında belirlenen farklı ifadeye sahip gen setlerinden oluşturulmuştur.

Farklı ifadeye sahip gen setlerinin gen ontolojisi ("Gene Ontology") (GO) terimi zenginleşme analizleri "WebGestalt" (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve spesifik olarak biyolojik süreçler alt başlığında odaklanılmıştır (120,121). Gen ontolojisi terimleri zenginleşme analizleri için, M x C, O x C ve V x C sınıf karşılaştırmaları sırasında elde edilen farklı ifadeye sahip gen setleri kullanılmış ve analizlerin tasarımı sırasında hipergeometrik test, çoklu karşılaştırma ayarlaması için Benjamini-Hochberg düzeltmesi ve bir kategorideki minimum gen sayısı olarak 2 seçilmiştir.

4.13. FARKLI İFADEYE SAHİP GENLERİN LOKUSLARI İLE GENOM BOYU İLİŞKİLENDİRME VE GENOM BOYU BAĞLANTI ÇALIŞMALARINDA TANIMLANMIŞ OLAN LOKUSLARIN KESİŞİMİ

Çalışmada belirlenen ve farklı ifadeye sahip olduğu gösterilen genlere ait lokuslar ile genom boyu ilişkilendirme ve bağlantı çalışmalarında işaret edilmiş lokuslar arasındaki kesişimleri ortaya koymak üzere, Kirino ve ark., Karasneh ve ark., Meguro ve ark., Gül ve ark., Lee ve ark. ve Kappen ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmalar kullanılmıştır (24,122–126). Bu amaçla, aralarında HLA lokusunun da (6p21.3) bulunduğu toplam 29 adet genomik lokus ile M x C, O x C ve V x C sınıf karşılaştırmaları sırasında belirlenen farklı ifadeye sahip gen setleri kullanılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. BEHÇET SENDROMLU OLGULARIN VE KONTROL GRUBUNUN TEMEL DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Behçet sendromlu olguların ve kontrol grubunda yer alan bireylerin temel demografik özellikleri Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Behçet sendromlu olguların ve kontrol grubunun temel demografik özellikleri

	Tüm BS (n=29)	**Kontrol (n=15)**	***p***	**MBS[1] (n=8)**	**OBS[1] (n=5)**	**VBS[1] (n=9)**	**Diğer BS[1] (n=7)**
Yaş[2] (m-M/ortanca)	18-58/32	19-57/36	0,711	25-57	18-58	27-56	18-40
Cinsiyet (E/K)	19/10	10/5	0,939	1/7	2/3	9/-	7/-

[1] Behçet sendromu alt grupları için sadece minimum ve maksimum yaşlar gösterilmiştir.
[2] Yaş, çalışmaya katılma anındaki yaşı göstermektedir.
BS, Behçet sendromu; m, minimum; M, maksimum; MBS, mukokütan Behçet sendromu; OBS, oküler Behçet sendromu; VBS, vasküler Behçet sendromu.

5.2. ÇALIŞMA GRUBUNUN DETAYLI DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmada yer alan BS olguları ile sağlıklı kontrollere ait detaylı demografik ve klinik bilgiler Çizelge 5.2.'de sunulmuştur (EK 4, Deney Tanımlayıcı Dosyası, "Experiment Descriptor File").

5.3. KARŞILAŞTIRMALI İFADE ANALİZLERİ İÇİN KULLANILAN PROB SET SAYISI

"BRB-ArrayTools" yazılımı ile 44 adet örneğin .cel dosyaları üzerinde gerçekleştirilen ön işlem basamaklarından sonra, "GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0" mikrodizinlerinde yer alan toplam 54.675 prob setinden **10.785** tanesi, ayarlanmış olan filtreleri de geçerek, izleyen analiz basamaklarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Sınıf karşılaştırması analizleri ve sınıf karşılaştırması analizleri sırasında elde edilen farklı ifadeye sahip gen setleri kullanılarak gerçekleştirilen "Venn", kümeleme ve GO terimi zenginleşme analizleri, seçilmiş olan bu 10.785 prob seti üzerinden tamamlanmıştır.

Çizelge 5.2. Behçet sendromlu olgular ile kontrol grubunda yer alan bireylerin detaylı demografik ve klinik özellikleri

Sıra	Grup	Cinsiyet	Yaş[1]	M	O	V	İlave Tutulum	BS Alt Grubu	Örnek[2]
1	Hasta	E	35	+	-	+	-	Vasküler	V1
2	Hasta	E	43	+	-	+	-	Vasküler	V2
3	Hasta	K	56	+	-	-	-	Mukokütan	M1
4	Hasta	E	24	+	+	-	-	Oküler	O1
5	Hasta	K	57	+	-	-	-	Mukokütan	M2
6	Hasta	E	32	+	-	+	Eklem	Diğer	D1
7	Hasta	E	18	+	-	-	Gastrointestinal	Diğer	D2
8	Hasta	E	28	+	-	+	-	Vasküler	V3
9	Hasta	E	33	+	-	+	-	Vasküler	V4
10	Hasta	K	58	+	+	-	-	Oküler	O2
11	Hasta	K	26	+	+	-	-	Oküler	O3
12	Hasta	K	47	+	+	-	-	Oküler	O4
13	Hasta	E	27	+	-	+	-	Vasküler	V5
14	Hasta	E	18	+	+	-	-	Oküler	O5
15	Hasta	E	30	+	-	+	Eklem	Diğer	D3
16	Hasta	E	56	+	-	+	-	Vasküler	V6
17	Hasta	E	28	+	-	+	-	Vasküler	V7
18	Hasta	K	42	+	-	-	-	Mukokütan	M3
19	Hasta	E	32	+	-	+	-	Vasküler	V8
20	Hasta	K	29	+	-	-	-	Mukokütan	M4
21	Hasta	K	46	+	-	-	-	Mukokütan	M5
22	Hasta	E	32	+	+	+	-	Diğer	D4
23	Hasta	K	25	+	-	-	-	Mukokütan	M6
24	Hasta	K	27	+	-	-	-	Mukokütan	M7
25	Hasta	E	53	+	-	-	-	Mukokütan	M8
26	Hasta	E	34	+	+	+	-	Diğer	D5
27	Hasta	E	22	+	-	+	Santral Sinir S.	Diğer	D6
28	Hasta	E	40	+	+	+	Eklem	Diğer	D7
29	Hasta	E	36	+	-	+	-	Vasküler	V9
30	Kontrol	E	19	-	-	-	-	-	C1
31	Kontrol	E	21	-	-	-	-	-	C2
32	Kontrol	E	27	-	-	-	-	-	C3
33	Kontrol	E	33	-	-	-	-	-	C4
34	Kontrol	E	34	-	-	-	-	-	C5
35	Kontrol	E	36	-	-	-	-	-	C6
36	Kontrol	E	37	-	-	-	-	-	C7
37	Kontrol	E	42	-	-	-	-	-	C8
38	Kontrol	E	48	-	-	-	-	-	C9
39	Kontrol	E	57	-	-	-	-	-	C10
40	Kontrol	K	24	-	-	-	-	-	C11
41	Kontrol	K	27	-	-	-	-	-	C12
42	Kontrol	K	42	-	-	-	-	-	C13
43	Kontrol	K	45	-	-	-	-	-	C14
44	Kontrol	K	57	-	-	-	-	-	C15

[1] Yaş, çalışmaya katılma anındaki yaşı göstermektedir.
[2] Örnek (deney) isimleri.
BS, Behçet sendromu; M, mukokütan yakınma/bulgular; O, oküler tutulum; V, vasküler tutulum.

5.4. SINIF KARŞILAŞTIRMASI ANALİZLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

Sınıf karşılaştırması analizleri sırasında belirlenen, farklı ifade düzeyine sahip gen sayıları ile ilgili detaylar Çizelge 5.3.'de yer almaktadır (EK 5, Sınıf Karşılaştırması Gen Listeleri).

Çizelge 5.3. Sınıf karşılaştırması analizlerinde belirlenen farklı ifadeye sahip gen sayıları

Karşılaştırılan Sınıflar	**Farklı İfade Edilen Gen Sayıları**					
	***p*≤0,05, FC≥1,5**			***p*≤0,05, FC≥2,0**		
	Total	**Artan[1]**	**Azalan[2]**	**Total**	**Artan[1]**	**Azalan[2]**
Behçet x Kontrol	662	150	512	28	13	15
Mukokütan x Kontrol	78	33	45	20	8	12
Oküler x Kontrol	118	24	94	8	4	4
Vasküler x Kontrol	3475	529	2946	555	107	448
Behçet x Kontrol	662	150	512	28	13	15
Mukokütan x Oküler	65	31	34	6	3	3
Mukokütan x Vasküler	2146	1708	438	324	222	102
Oküler x Vasküler	1125	998	127	142	114	28

[1] Birinci sınıfta (örneğin, Behçet) ikinci sınıfa (örneğin, Kontrol) göre artmış ifade.
[2] Birinci sınıfta (örneğin, Behçet) ikinci sınıfa (örneğin, Kontrol) göre azalmış ifade.
Behçet, tüm Behçet sendromu olgularını içeren grup; Kontrol, kontrol grubu; FC, "fold change", kat değişimi; Mukokütan, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; Oküler, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; Vasküler, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

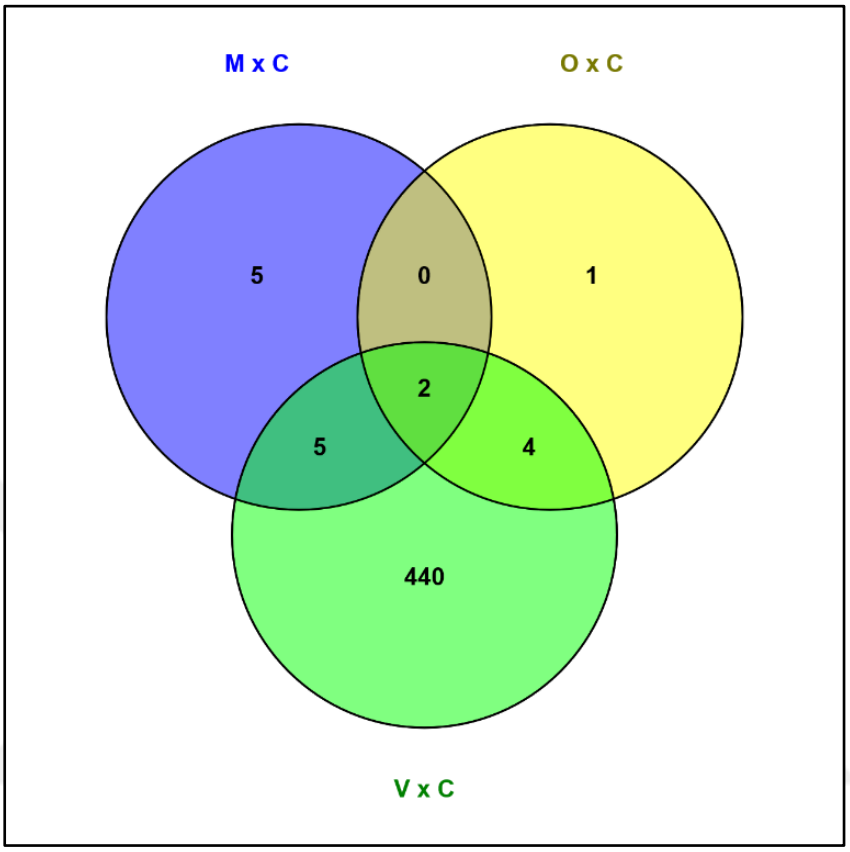
Behçet sendromu alt grupları ile kontrol grubu sınıf karşılaştırmaları için $p \leq 0,05$ ve FC≥1,5 seçilmesi ile elde edilen farklı ifadeye sahip gen setlerinde, FC değerlerine göre, büyükten küçüğe doğru sıralanmış ilk 20 gen Çizelge 5.4.'de gösterilmektedir. Söz konusu farklı ifadeye sahip gen setlerinin eksiksiz listeleri EK 5'de sunulmuştur.

Çizelge 5.4. Sınıf karşılaştırması analizlerinde belirlenen ve FC değerlerine göre sıralanmış ilk 20 farklı ifadeye sahip gen[1]

	Artan[2]				Azalan[3]		
	Gen Sembolü	**FC**	***p***		**Gen Sembolü**	**FC**	***p***
M x C							
1	*XIST*	20,93	0,01129	**1**	*RPS4Y1*	-11,82	0,00747
2	*IFI27*	3,49	0,01443	**2**	*EIF1AY*	-5,37	0,00837
3	*TMEM158*	2,59	0,01180	**3**	*DDX3Y*	-5,21	0,00697
4	*PIGC*	1,88	0,04074	**4**	*TXLNGY*	-3,64	0,00459
5	*EPSTI1*	1,85	0,03853	**5**	*KDM5D*	-3,35	0,00966
6	*FRMD3*	1,83	0,00517	**6**	*CLEC12A*	-3,17	0,00068
7	*IFIT3*	1,83	0,03644	**7**	*UTY*	-2,39	0,02231
8	*OASL*	1,79	0,02884	**8**	*NAPSB*	-2,08	0,00083
9	*TRBV27*	1,75	0,04365	**9**	*LRRN3*	-2,02	0,02903
10	*CD274*	1,73	0,03022	**10**	*H3F3A*	-1,79	0,00004
O x C							
1	*FKBP5*	2,68	0,00120	**1**	*CLEC12A*	-2,78	0,01763
2	*IFI27*	2,14	0,00319	**2**	*CLC*	-2,57	0,01603
3	*FECH*	2,14	0,03691	**3**	*CDKN1C*	-2,05	0,00849
4	*HEMGN*	2,02	0,03288	**4**	*KLRC3*	-1,98	0,03747
5	*ECHDC3*	1,88	0,04113	**5**	*COL18A1*	-1,94	0,00523
6	*RAP1GAP*	1,80	0,03904	**6**	*PRSS33*	-1,91	0,04309
7	*ZCCHC2*	1,78	0,00517	**7**	*C1orf21*	-1,86	0,01042
8	*IL13RA1*	1,76	0,00691	**8**	*LINC00926*	-1,84	0,00306
9	*MALAT1*	1,76	0,00925	**9**	*KLRF1*	-1,80	0,03415
10	*RNF182*	1,73	0,03784	**10**	*MRPL22*	-1,80	0,01458
V x C							
1	*ARG1*	6,55	3,2e-06	**1**	*XIST*	-6,29	0,04891
2	*DEFA4*	5,29	0,00057	**2**	*MS4A1*	-6,14	2,7e-05
3	*IFI27*	4,34	0,00041	**3**	*IGHM*	-5,17	8,8e-05
4	*ECHDC3*	3,64	9,3e-05	**4**	*FCER1A*	-4,63	0,00051
5	*CA1*	3,58	0,00162	**5**	*LRRN3*	-4,38	4,0e-05
6	*IL1R2*	3,54	0,00028	**6**	*HLA-DQA1*	-4,05	0,01032
7	*ANKRD22*	3,53	0,00137	**7**	*CLC*	-3,57	0,00011
8	*DAAM2*	3,50	0,00126	**8**	*PAX5*	-3,49	2,4e-05
9	*EIF1AY*	3,50	0,01910	**9**	*RCAN3*	-3,45	1,4e-06
10	*ELANE*	3,48	0,00164	**10**	*BANK1*	-3,39	1,4e-05
					CLEC12A	-2,35	0,00696

[1] Tüm sınıf karşılaştırmaları (M x C, O x C ve V x C) için $p \leq 0,05$ ve FC≥1,5.
[2] Birinci sınıfta (örneğin, M) ikinci sınıfa (örneğin, C) göre artmış ifade.
[3] Birinci sınıfta (örneğin, M) ikinci sınıfa (örneğin, C) göre azalmış ifade.
C, kontrol grubu; FC, "fold change", kat değişimi; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

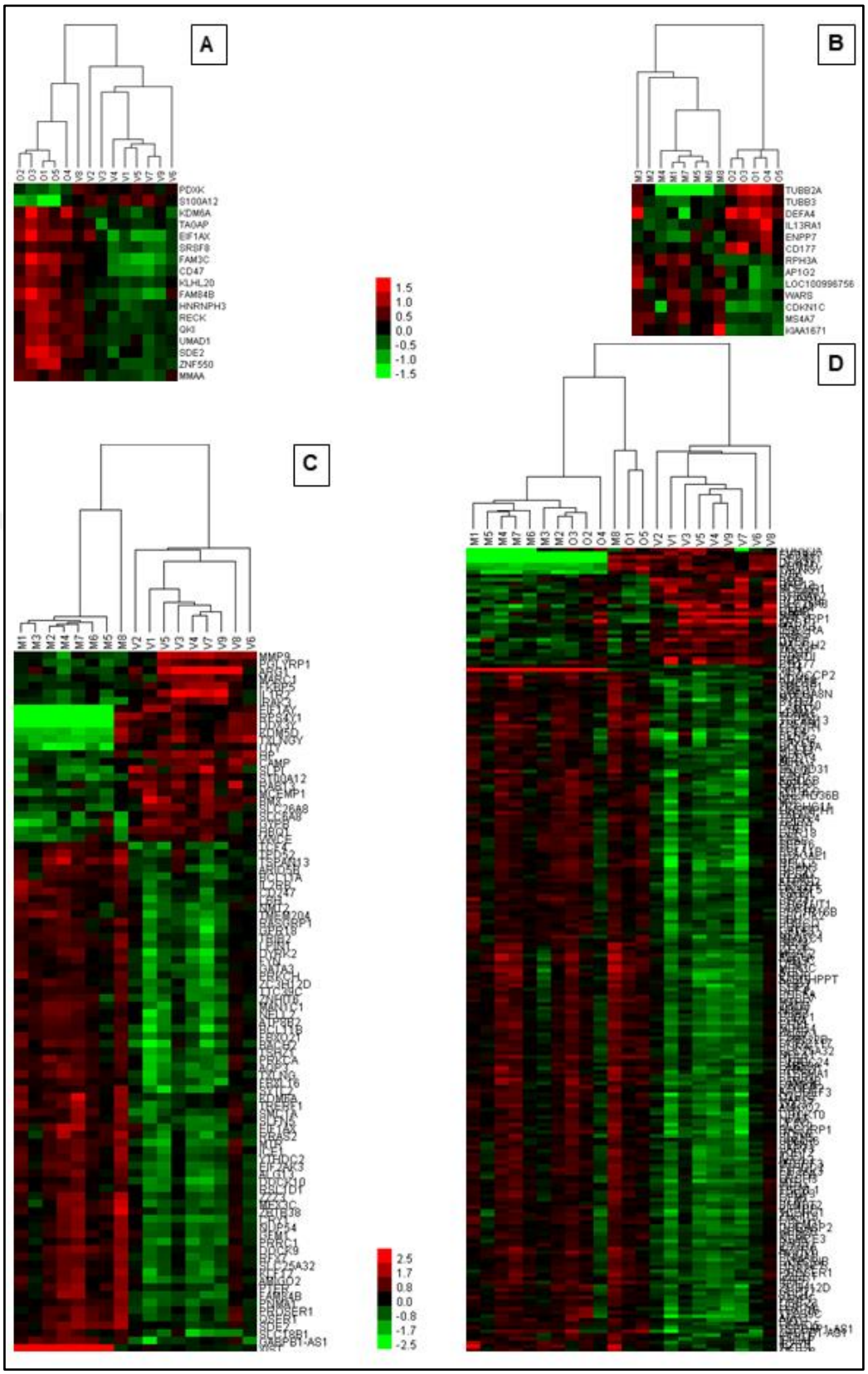
Behçet sendromu alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmalarında (M x C, O x C ve V x C, hepsi için $p \leq 0,05$ ve FC$\geq$2,0) elde edilen farklı ifadeye sahip gen setleri ile gerçekleştirilen "Venn" analizine ait diyagram Şekil 5.1.'de yer almaktadır.



Şekil 5.1. Behçet sendromu alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmalarında elde edilen gen setleri ile gerçekleştirilen "Venn" analizi diyagramı (M x C ∩ O x C: *CLEC12A, IFI27*; M x C ∩ V x C: *CLEC12A, IFI27, NAPSB, EIF1AY, XIST, TMEM158, LRRN3*; O x C ∩ V x C: *CLEC12A, IFI27, FKBP5, CDKN1C, CLC, FECH*; M x C ∩ O x C ∩ V x C: *CLEC12A, IFI27*)
C, kontrol grubu; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

5.5. BEHÇET SENDROMU ALT GRUPLARINA AİT KÜMELEME ANALİZLERİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

Behçet sendromlu olguların alt grupları arasında gerçekleştirilen kümeleme analizlerine ait dendrogram ve ısı haritası ("heatmap") gösterimleri Şekil 5.2'de sunulmuştur. Kümeleme analizleri sırasında kullanılan gen setlerine ait *p* ve FC değerleri, sırasıyla, M x O için ≤0,01 ve ≥1,5, M x V için ≤0,001 ve ≥2, O x V için ≤0,001 ve ≥1,5 ve M x O x V için ise ≤0,001 (ANOVA) şeklinde seçilmiştir (EK 6, Kümeleme Analizleri Gen Listeleri).



Şekil 5.2. Behçet sendromu alt grupları arasında gerçekleştirilen kümeleme analizlerine ait dendrogram ve ısı haritası gösterimleri (O x V [A], M x O [B], M x V [C] ve M x O x V [D], örnekler sütunlarda ve genler satırlarda yer almaktadır)

M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

5.6. GEN ONTOLOJİSİ ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

Behçet sendromu alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmalarında elde edilen farklı ifadeye sahip gen setlerinin incelendiği gen ontolojisi (zenginleşme) analizlerine ait seçilmiş bulgular Çizelge 5.5.'de yer almaktadır (EK 7, Gen Ontolojisi Analizleri Bulguları).

Çizelge 5.5. Gen ontolojisi analizlerine ait bulgular[1, 2, 3]

GO Kategorileri	GO No	G	Ob	E	R	*p*	FDR
M x C							
Protein homodimerizasyon aktivitesinin düzenlenmesi	0043496	21	2	0,057	34,90	0,00148	0,87182
Yaralanmaya yanıt	0009611	635	7	1,733	4,04	0,00152	0,87182
Tip I interferon sinyal yolağı	0060337	84	3	0,229	13,09	0,00155	0,87182
Tip I interferona hücresel yanıt	0071357	84	3	0,229	13,09	0,00155	0,87182
Hücre göçünün pozitif düzenlenmesi	0030335	467	6	1,275	4,71	0,00158	0,87182
Kan pıhtılaşması	0007596	318	5	0,868	5,76	0,00167	0,87182
Pıhtılaşma	0050817	322	5	0,879	5,69	0,00176	0,87182
Hemostaz	0007599	323	5	0,882	5,67	0,00178	0,87182
Tip I interferona yanıt	0034340	89	3	0,243	12,35	0,00183	0,87182
O x C							
İmmün yanıt	0006955	1867	27	9,24	2,92	1,266e-7	0,00115
Lökosit göçü	0050900	414	11	2,05	5,37	5,775e-6	0,02614
Adaptif immün yanıt	0002250	377	10	1,87	5,36	1,616e-5	0,03764
Lökosit hücre-hücre adezyonu	0007159	315	9	1,56	5,77	2,475e-5	0,03764
İmmün sistem süreçlerinin düzenlenmesi	0002682	1371	19	6,79	2,80	2,894e-5	0,03764
Lökosit göçünün düzenlenmesi	0002685	179	7	0,89	7,90	2,910e-5	0,03764
Myeloid lökosit göçü	0097529	194	7	0,96	7,29	4,863e-5	0,05503
Lenfosit aktivasyonu	0046649	636	12	3,15	3,81	6,385e-5	0,05590
T hücresi aracılıklı immünite	0002456	99	5	0,49	10,20	0,00013	0,07352
İnterlökin-2 üretiminin düzenlenmesi	0032663	54	4	0,27	14,96	0,00015	0,07457
V x C							
Lökosit aktivasyonu	0045321	1169	248	156,8	1,58	1,31e-14	4,7e-12
Lenfosit aktivasyonu	0046649	636	153	85,3	1,79	9,41e-14	2,4e-11
İmmün yanıt	0006955	1867	347	250,4	1,39	1,19e-11	2,4e-9
Hematopoetik ya da lenfoid organ gelişimi	0048534	825	176	110,7	1,59	8,17e-11	1,2e-8
Lenfosit farklılaşması	0030098	336	89	45,1	1,98	8,94e-11	1,3e-8
İmmün yanıtın düzenlenmesi	0050776	889	181	119,2	1,52	2,15e-9	2,4e-7
Lökosit aktivasyonunun düzenlenmesi	0002694	475	104	63,7	1,63	1,81e-7	1,5e-5
İmmün yanıtı aktive eden hücre yüzey reseptörü sinyal yolağı	0002429	296	70	39,7	1,76	1,05e-6	7,3e-5
Sitokin üretiminin düzenlenmesi	0001817	630	126	84,5	1,49	1,74e-6	0,00011
Lökosit hücre-hücre adezyonunun düzenlenmesi	1903037	282	65	37,8	1,72	6,25e-6	0,00034

[1] Tüm sınıf karşılaştırmaları (M x C, O x C ve V x C) için $p \leq 0,05$ ve FC$\geq$1,5.

[2] Her bir sınıf karşılaştırması için, *p* değerlerine göre küçükten büyüğe doğru sıralanmış ve immünopatolojik önemi olduğu öngörülen, ilk 10 GO kategorisi gösterilmiştir.

[3] Gen ontolojisi terimleri zenginleşme analizleri spesifik olarak, "Biyolojik Süreç" alt başlığı üzerinde odaklanmıştır.

C, kontrol grubu; E, gen setinde bulunması beklenen GO kategorisine ait gen sayısı; FDR, "False Discovery Rate", yanlış bulgu oranı; G, GO kategorisindeki referans gen sayısı; GO, gen ontolojisi; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; Ob, hem gen setinde hem de GO kategorisinde ortak olarak bulunan gen sayısı; R, zenginleşme oranı; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

5.7. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN GEÇERLİ KILMA DENEYLERİNE AİT BULGULAR

Hibridizasyon bazlı bir yaklaşımla, mikrodizin teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen ifade analizi deneyleri sonucunda elde edilen bulguların, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılan geçerli kılma (validasyon) deneylerine ait sonuçlar Çizelge 5.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.6. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilen geçerli kılma deneylerine ait bulgular[1, 2]

Gen	Karşılaştırma	Mikrodizin[3]	qRT-PCR[3]	Notlar
IFI27	M x C	3,49	3,83	Uyumlu (artış)
RSAD2	M x C	3,33	2,57	Uyumlu (artış)
IFI44L	M x C	2,94	2,25	Uyumlu (artış)
CLEC12A	M x C	-3,17	0,45	Uyumlu (azalma)
ARG1	V x C	6,55	4,53	Uyumlu (artış)
DEFA4	V x C	5,29	3,97	Uyumlu (artış)
MS4A1	V x C	-6,14	0,26	Uyumlu (azalma)
IGHM	V x C	-5,17	0,29	Uyumlu (azalma)
IFIT1	M x V	3,35	2,68	Uyumlu (artış)
CMPK2	M x V	2,85	2,60	Uyumlu (artış)
TUBB2A	M x V	-6,25	0,53	Uyumlu (azalma)
ORM1	M x V	-2,86	0,76	Uyumlu (azalma)

[1] Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu hesaplamaları için "delta delta Ct" metodu kullanılmıştır.
[2] Hizmetçi ("housekeeping") gen Peptidilprolil İzomeraz B (*PPIB*) olarak seçilmiştir.
[3] Kat değişimi (FC, "fold change") değerleri gösterilmektedir.
C, kontrol grubu; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

5.8. GENOM BOYU İLİŞKİLENDİRME VE GENOM BOYU BAĞLANTI ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR İLE KESİŞİMLER

Behçet sendromu için gerçekleştirilmiş olan genom boyu ilişkilendirme ve genom boyu bağlantı çalışmalarında önem kazanan genomik lokuslarla, çalışmamızda, BS alt grupları ile kontrol grubu arasındaki sınıf karşılaştırmaları sırasında belirlenen ve farklı ifadeye sahip genlerin lokuslarına ait kesişimler Çizelge 5.7.'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.7. Genom boyu ilişkilendirme ve genom boyu bağlantı çalışmalarına ait lokuslar ile farklı ifade düzeyine sahip oldukları gösterilen genlerin kesişimleri[1]

GWAS/GWLS Lokusları	Aynı Lokusta Yer Alan ve Farklı İfade Edilen Genler	Notlar
1p31.3[2]	*GADD45A, USP1*	V x C
1p36[3]	*AGMAT, CROCCP2, E2F2, ID3, MAN1C1, NIPAL3, PLEKHN1, RAP1GAP, RCAN3, RHD, SRSF10, TNFRSF25*	M x C, O x C, V x C
1q31-q32(.1)[2]	*DIEXF, ELK4, FCMR, FLVCR1-DT, NEK7, NUCKS1, PFKFB2, RCOR3, TRAF3IP3, TRAF5, YOD1*	O x C, V x C
2q32.2-q32.3[2]	*C2orf88, GLS, HIBCH, SLC39A10*	V x C
3p12[4]	-	-
3p21[2]	*CACNA2D3, CAMP, KIAA1143, LTF, NEK4, TMEM158*	M x C, V x C
4p15[3]	*DCAF16, FGFBP2, RAB28, SEL1L3, TAPT1*	V x C
5q12[3]	*SMIM15, SREK1*	V x C
5q15[2]	*TTC37*	V x C
5q23[3]	*HINT1, ISOC1, LYRM7, PRRC1, ZNF608*	V x C
6p21.3[1]	*FKBP5, HLA-DOB, HLA-DPA1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, KCTD20, SLC26A8*	M x C, O x C, V x C
6p22-23[5]	*BTN3A2, GMPR, RNF182, SOX4, TRIM10*	O x C, V x C
6q16[3]	*CCNC, UFL1*	V x C
6q25-26[3]	*EZR, MAP3K4, SOD2*	Önemli lokus[3, 4], M x C, O x C, V x C
6q25.1[4]	*ZC3H12D*	V x C
7p21[3]	*NDUFA4, PHF14, TMEM106B, TSPAN13, TWISTNB*	M x C, O x C, V x C
7q36.1[6]	-	-
10q24[3]	*BLNK, ERLIN1, TM9SF3*	O x C, V x C
12p12-13[3]	*ACRBP, AEBP2, CCND2, CLEC4E, CLEC12A, CREBL2, KLRB1, KLRC3, KLRF1, LOC374443*	Önemli lokus[3, 4], M x C, O x C, V x C
12p12.1[4]	*ETNK1, LDHB, GOLT1B, PYROXD1*	V x C
12p13.2-p12.3[2]	*AEBP2, CREBL2, KLRC3*	O x C, V x C
12q13[3]	*AMIGO2, ATF1, ESYT1, LIMA1, SLC38A1*	V x C
16q12[3]	*CHD9, PAPD5*	V x C
16q21-23[3]	*ADGRG1, ATMIN, CMTR2, HP, MAF, NAE1, NPIPB15*	M x C, O x C, V x C
17p13[3]	*ALOX12, C1QBP, CLEC10A, GLOD4, NUP88, P2RX1, RILP, ZFP3*	M x C, O x C, V x C
18q22.3[7]	*TSHZ1, ZADH2*	O x C, V x C
20q12-13[3]	*ARFGEF2, CSE1L, FAM210B, MMP9, NFATC2, SLPI, TUBB1*	M x C, V x C
22q11.22[4]	*IGLC1, VPREB3*	V x C
Xq26-28[3]	*SLC6A8, STK26, TKTL1, VMA21*	V x C

[1] HLA lokusu da (6p21.3) yer almaktadır.

[2] Kirino ve ark. 2013 (24), [3] Karasneh ve ark. 2005 (122), [4] Meguro ve ark. 2009 (123), [5] Gul ve ark. 2001 (124), [6] Lee ve ark. 2012 (125), [7] Kappen ve ark. 2015 (126).

C, kontrol grubu; GWAS, genom boyu ilişkilendirme çalışması; GWLS, genom boyu bağlantı çalışması; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türk BS olguları ile uyumlu seçilmiş sağlıklı kontrol grubu bireylerinde karşılaştırmalı bir genom boyu ifade analizi gerçekleştirilmiş, hasta ve kontrol grupları arasında farklı ifadeye sahip gen setleri ortaya konmuş ve söz konusu gen setleri, biyoinformatik ve gen ontoloji analizleri ile değerlendirilmiştir. Türk BS olgularında hastalık gelişiminde rol oynayan moleküler hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasının ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının geliştirilmesi için değer taşıyabilecek genlere ulaşılmasının amaçlandığı bu çalışmada, güncel literatürde yer alan ve benzer şekilde BS durumunda genom boyu ifade analizinin gerçekleştirildiği diğer çalışmalardan farklı bir çalışma tasarımı kullanılmıştır (127–131). Bir hastalık mı yoksa bir sendrom mu olduğu hala tartışıladursun, BS'yi konu alan çalışmalarda olgular, klinik özelliklerine göre daha önceden tanımlanmış farklı hastalık öbeklerinde de olsalar, tek bir grup olarak ele alınarak incelenmektedir (127–131). Mevcut çalışmada ise, daha önce Oğuz ve arkadaşları tarafından BS alt grupları arasında gösterilen önemli gen ifadesi ve moleküler hastalık mekanizmaları farklılıklarından yola çıkılarak, BS olguları klinik özelliklerine uygun hastalık öbeklerinde gruplanarak incelenmiştir (10). Çalışma sonucunda ulaşılan bulgular, [1] farklı klinik özellikler sergileyen BS olgularının tek bir hasta grubu şeklinde incelenmesi sırasında moleküler düzeyde bilgi kaybı oluştuğunu, [2] özellikle mukokütan ve oküler BS ile vasküler BS olguları arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunduğunu, [3] Türk BS olgularında *CLEC12A*, *IFI27* ve *CLC* isimli doğal bağışıklık genlerinin önemli patogenetik rolleri olabileceğini ve [4] mukokütan BS olgularında doğal bağışıklık yanıtı ile ilgili biyolojik süreçler fonksiyonel görünürken, oküler ve vasküler BS olgularında ilave olarak adaptif bağışıklık süreçlerinin de rol oynadığını ortaya koymuştur.

Literatürde, aralarında Xavier ve ark., Tulunay ve ark., Okuzaki ve ark., Puccetti ve ark. ile Verrou ve arkadaşları'na ait çalışmaların yer aldığı, Behçet sendromu durumunda genom boyu ifade analizi gerçekleştirilen 5 çalışma yer almaktadır (127–131). Bu çalışmalarla ilgili temel bilgiler Çizelge 6.1.'de sunulmuştur. Yukarıda değinildiği ve Çizelge 6.1.'de de görüleceği gibi, değişken ve zaman zaman çelişen immünolojik anormalliklerin belirlendiği, coğrafi bölgeye göre klinik özelliklerinin farklılıklar gösterdiği, kendi içinde çeşitli hastalık öbeklerinin tanımlanmış olduğu ve günümüzde bir sendrom olarak kabul edilmesi ve isimlendirilmesi görüşünün ağır bastığı BS durumunda, gerek klinik gerekse moleküler düzeydeki çalışmalarda BS olguları, halen tek bir hasta grubu olarak ele alınmakta ve incelenmektedir (16). Söz konusu çalışma tasarımı, bu çalışmalarda elde

edilen bulguları önemli ölçüde etkileyebilecek nitelikte olduğundan, çalışmamıza ait bulguların detaylı ve karşılaştırmalı tartışmasına girmeden önce, literatürde yer alan ve BS durumunda genom boyu ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalara ait esas bulgular, burada kısaca özetlenecektir.

Çizelge 6.1. Literatürde yer alan ve Behçet sendromu durumunda genom boyu ifade analizinin gerçekleştirildiği çalışmalarla ilgili temel bilgiler

Çalışma	Tarih	Olgu/Kontrol Sayıları	Olgu Grupları	Metodoloji	Hücre Doku	*p*/FC	İlave Çalışma
Xavier ve ark.[1]	2013	15/14	Tek grup	Mikrodizin	PKMH	0,05/1,2	İlişkilendirme
Tulunay ve ark.[2]	2014	9/9	Tek grup	Mikrodizin	M+Th	-/1,5	Akım Sito.
Okuzaki ve ark.[3]	2016	41/17	Tek grup	Mikrodizin	PKMH	-/-	Dizileme
Puccetti ve ark.[4]	2018	10/10	Tek grup	Mikrodizin	PKH	0,01/2,0	Akım Sito.
Verrou ve ark.[5]	2021	14/11	Tek grup	YND	PKMH	0,05/2,0	-

[1] Xavier ve ark. 2013 (131).
[2] Tulunay ve ark. 2014 (130).
[3] Okuzaki ve ark. 2016 (129).
[4] Puccetti ve ark. 2018 (128).
[5] Verrou ve ark. 2021 (127).
FC, kat değişimi ("Fold Change"); M, monosit; PKH, periferik kan hücreleri; PKMH, periferik kan mononükleer hücreleri; Th, yardımcı T hücresi; YND, yeni nesil dizileme.

Xavier ve arkadaşları gen ifade analizi ile ilişkilendirme çalışmalarını bir arada gerçekleştirdikleri araştırmalarında, BS olgularında, Epiregulin (*EREG*), Amphiregulin (*AREG*) ve Neuregulin-1 (*NRG1*) genlerinin azalmış ifadeleri ile birlikte, söz konusu genlerin içinde yer aldığı "neuregulin" sinyal yolağının önem kazandığını göstermişlerdir (131). Bilindiği gibi *EREG-AREG* ve *NRG1*, epidermal büyüme faktörü (*EGF*) ailesinin üyeleridir. Aynı çalışmanın ikinci bölümünde araştırmacılar, 976 İran'lı BS olgusu ve 839 kontrol bireyi üzerinde bir ilişkilendirme çalışması yürüterek, *EREG-AREG* lokusunda yeni bir tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (rs6845297) tanımlamış ve *NRG1* lokusunda ise daha önce gösterilmiş olan üç SNP'yi replike etmişlerdir (rs4489285, rs383632 ve rs1462891) (131). Bu şekilde Xavier ve arkadaşları, *EREG-AREG* ve *NRG1* genlerinin ve *EGF*/*ErbB* sinyal yolağının BS yatkınlığında rol oynuyor olabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Tulunay ve arkadaşları gerçekleştirmiş oldukları genom boyu ifade çalışmasında, BS olgularında daha önce gösterilmiş olan Th1/Th17 tipi bağışıklık yanıtı aktivasyonundan sorumlu sinyal yolaklarını ortaya koymaya çalışmışlardır (130). Bu çalışmada, gen ifade analizi için spesifik olarak CD14+ monositler ve CD4+ T lenfositler izole edilerek incelenmiş ve ilave olarak, akım sitometrisi ile periferik kan mononükleer hücrelerinde *STAT3* ve *pSTAT3* ifadeleri araştırılmıştır (130). Bulgular, BS olgularında kontrole oranla,

çalışılan her iki hücre popülasyonunda da *JAK1* ifadesinin artmış olduğunu ve zenginleşme analizleri ise, *JAK*/*STAT*, interferon, glukokortikoid reseptör ve IL-6 sinyal yolaklarının öne çıktığını göstermiştir (130). Akım sitometrisi analizlerinin, BS durumunda *STAT3* ifadesinin belirgin olarak artmış olduğuna işaret ettiği çalışmalarının sonunda Tulunay ve arkadaşları, BS olgularında *JAK1*/*STAT3* sinyal yolağının aktive olduğunu ve burada muhtemelen, aralarında IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-17 ve IL-23'ün de bulunduğu Th1/Th17 tipi sitokinlerin rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Okuzaki ve arkadaşları, Japon BS olgularını inceledikleri çalışmalarında, mikrodizin temelli bir gen ifade analizi uygulayarak olgulara ait periferik kan mononükleer hücrelerinde *IL23R* gen ifadesinin arttığını gösterdiler (129). Bu bulguya ilaveten, *IL23R* lokusunun BS için bir yatkınlık lokusu olduğuna işaret eden önceki bir çalışmayı da dikkate alan araştırmacılar, söz konusu genomik bölgeyi dizi analizi ile incelemişlerdir. Okuzaki ve arkadaşlarının çalışmasına ait dizi analizi sonuçları, ilgili lokusta daha önce de BS ile ilişkilendirilmiş bir SNP için karakteristik bir genotipi ortaya koymuştur (129). Araştırmacıların, orijinal çalışma gruplarında yer alan 4 ailevi BS olgusu üzerinde gerçekleştirdikleri ileri analizler ise, *IL23R*'ye ilave olarak *IRAK4*, *NRP14* ve *MAGEE2* genlerine ait 19 yeni SNP'yi göstermiştir (129). Okuzaki ve arkadaşları çalışmalarının sonunda, tanımlamış oldukları SNP'lerin BS için karakteristik genetik belirleyiciler olabileceğini ifade etmişlerdir.

Behçet sendromu patogenezini aydınlatmaya çalıştıkları araştırmalarında Puccetti ve arkadaşları, genom boyu ifade analizi ile akım sitometrisini birlikte kullanmışlardır (128). Bu çalışmada belirlenen farklı ifade düzeyine sahip genler kullanılarak yapılan biyoinformatik analizler, Th17 ilişkili yolaklar ile tip I interferon sinyal yolaklarında zenginleşme bulguları ortaya koymuştur (128). Çalışmaya ait akım sitometrisi incelemeleri de transkriptom düzeyindeki Th17 polarizasyonunu desteklerken, gen setlerinin fonksiyonel sınıflandırması inflamasyon, vasküler zedelenme ve kan pıhtılaşması ile ilgili başlıkları öne çıkarmıştır (128). Puccetti ve arkadaşları elde ettikleri bulguların, BS patogenezinde otoimmün bir bileşen bulunduğuna işaret ettiğini öne sürmüşlerdir (128).

Verrou ve arkadaşları, yeni nesil dizileme teknolojisi ile bir gen ifade analizi gerçekleştirerek, BS'ye ait moleküler hastalık mekanizmalarını aydınlatmaya çalışmışlardır (127). Bu çalışmaya ait bulgular, farklı ifadeye sahip genler arasında en üst sıralarda artmış ifade gösteren kemokin genlerinin bulunduğunu ve yolak analizlerindeki en yüksek

zenginleşme oranlarının, özellikle nötrofilleri ilgilendiren lökosit göçü süreçleri ile NF-kB, TNF ve IL-1 sinyal yolaklarında belirlendiğini ortaya koymuştur (127). Verrou ve çalışma arkadaşları elde ettikleri bulgulara dayanarak, BS patogenezinde adaptif bağışıklık yanıtı ile ilgili major bir bileşen bulunmadığını, bunun yerine, artmış nötrofil kemotaksisi ile birlikte anormal bir doğal bağışıklık yanıtının devrede bulunduğunu savunmuşlardır (127).

Oğuz ve arkadaşları, Xavier ve arkadaşlarına ait çalışmanın genom boyu ifade verisini "Gene Expression Omnibus" (GEO) veritabanından ödünç alarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, BS olgularını klinik özelliklerine göre mukokütan, oküler ve vasküler hastalık öbeklerinde gruplandırarak incelemişlerdir (10). Aynı gen ifadesi verisinin farklı bir tasarım ile değerlendirildiği bu çalışmada, farklı hastalık öbeklerindeki BS olgularının birbirlerinden farklı gen ifade profillerine sahip olduğu ve farklı hastalık yolaklarında zenginleşme gösterdikleri belirlenmiştir (örneğin, mukokütan BS grubunda IL-8 üretimi ve oküler BS grubunda ise mikroorganizmalara karşı bağışıklık yanıtı ile ilgili yolaklar) (10). Aynı çalışmaya ait bir diğer bulgu da, BS gelişiminde, enflamasyonun negatif düzenlenmesi (örneğin, *CD69, TNFAIP3*), nötrofil granül proteinleri, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve antijen işlenmesi/sunumu ile ilgili genlerin etkili olabileceklerinin gösterilmiş olmasıdır (10). Oğuz ve arkadaşları çalışma sonunda elde ettikleri bulgulara dayanarak, gelecekte ve özellikle de moleküler düzeyde planlanacak BS çalışmalarında BS'nin immünogenetik heterojenitesinin dikkate alınması gerektiğini ve literatürde "Behçet sendromu" şeklindeki isimlendirmenin tercih edilerek kullanılmasının doğru olacağını öne sürmüşlerdir (10).

Bu aşamada, bulguları yukarıda özetlenmeye çalışılan araştırmalarla ilgili olarak, vurgulanması gereken iki önemli nokta olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki, 5 çalışmanın her birinin farklı bir ülkeye, dolayısı ile farklı özelliklere sahip popülasyonlara ait olduğudur (Xavier ve ark. Portekiz, Tulunay ve ark. Türkiye, Okuzaki ve ark. Japonya, Puccetti ve ark. İtalya, Verrou ve ark. Yunanistan) (127–131). Behçet sendromu'nun üzerinde sık görüldüğü coğrafya olan "İpek Yolu" boyunca dahi, bölgesel olarak, klinik özellikler açısından farklılıklar gösterdiği iyi bilinmektedir (109). Burada, günümüzde kompleks otoenflamatuvar bir sorun olarak değerlendirilen BS durumunda, çevresel faktörleri ilgilendiren değişiklikler kadar, farklı popülasyonlara ait immünogenetik değişikliklerin de fonksiyonel olabileceği hatırlanmalıdır. İkinci önemli nokta ise, çalışmalara ait bulgular arasında, birbiriyle örtüşenlerin yanında birbirleriyle çelişebilecek bulguların da mevcut olduğudur. Söz konusu duruma bir örnek olarak, Puccetti ve

arkadaşlarının BS patogenezinde otoimmün bir bileşen bulunduğuna işaret eden bulguları ile Verrou ve arkadaşlarının BS patogenezinde adaptif bağışıklık yanıtı ile ilgili önemli bir bileşen bulunmadığını düşündüren bulguları gösterilebilir (127,128). Behçet sendromu ile ilgili literatürde, daha önceleri de yer alarak dikkat çekmiş olan bu değişken ve zaman zaman çelişkili görülen immünolojik bulgular için, çalışmalar arasında farklılık gösterebilen BS klinik aktivitesinin, "in-vitro" bulgular ile "in-vivo" durum arasındaki uyumsuzluğun, standardize edilmesi mümkün olmayan ilaç etkilerinin ve kullanılan farklı laboratuvar metodolojilerinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (30). Bugün, tüm bu faktörlere ilaveten, söz konusu immünolojik bulgu çeşitliliğinden, değişik BS olgusu popülasyonlarına ve birbirinden farklı BS hastalık öbeklerine ait moleküler düzeydeki değişikliklerin de sorumlu olabileceği anlaşılmıştır (10).

Çalışmamızda, toplam 29 BS olgusunun bulunduğu hasta grubunda 3 eklem tutulumu olan (D1, D3 ve D7), 1 gastrointestinal sistem tutulumu olan (D2), 1 SSS tutulumu olan (D6) ve 2 eş zamanlı oküler ve vasküler tutulumları olan (D4 ve D5) BS olgusu bulunmaktaydı (Çizelge 5.2.). Söz konusu 7 BS olgusu, çalışma tasarımı ve örneklem büyüklüklerinin küçük oluşu nedeniyle sınıf karşılaştırması analizlerine dahil edilmemişlerdir (132). Bilindiği gibi Behçet sendromu epidemiyolojisini konu alan çalışmalar, sendromun endemik coğrafyası (İpek Yolu) üzerinde eşit bir erkek/kadın oranını ve erkeklerde daha şiddetli hastalık seyrini vurgularken, BS'nin seyrek olarak izlendiği coğrafi bölgelerde kadın olgu sayısının daha yüksek olabileceğine ve olgularda daha hafif seyirli bir hastalığa işaret etmektedir (5,133). Çalışmamızda mukokütan, oküler ve vasküler BS gruplarında yer alan toplam 22 BS olgusunun, 1,2 olarak bulunan erkek/kadın oranı ve orantısal olarak mukokütan gruptaki kadın ve vasküler gruptaki erkek olgu hakimiyeti dikkate alındığında, hasta grubumuzun epidemiyolojik özellikleri açısından ilgili literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Çizelge 5.1.).

Çalışmamıza ait sınıf karşılaştırması analizleri sırasında gerçekleştirilen ve bütün BS olgularını barındıran grubu (B), BS alt gruplarını (M, O ve V) ve sağlıklı kontrol grubunu (K) içeren mukayeseler sonucunda elde edilen farklı ifadeye sahip gen sayıları, Çizelge 5.3.'de detayları ile sunulmuştu. Sınıf karşılaştırması amacıyla *p* değerinin ≤0,05 ve FC'nin ≥2,0 seçilmesi ile B x K için 28, V x K için 555, M x V için 324 ve O x V için de 142 olarak tespit edilen farklı ifadeye sahip gen sayıları, [1] BS alt grupları / hastalık öbekleri arasında moleküler düzeyde de tespit edilebilen bir heterojeniteye ve [2] farklı BS hastalık

öbeklerine ait olguların bir arada değerlendirilmesinin, moleküler düzeyde bilgi kaybına yol açtığına işaret etmektedir. Benzer bulgular, Oğuz ve arkadaşlarının çalışmasında da dikkat çekmiş ve bildirilmişti (10). Araştırmacılar yazılarında, bizim çalışmamızdakine benzer seçilmiş BS alt grupları arasında moleküler düzeydeki belirgin bir heterojeniteye ve BS olgularının adeta "havuzlanarak" toplu bir şekilde kontrol grubuyla karşılaştırılmasının, ortaya konabilecek farklı ifadeye sahip gen sayısında belirgin bir azalmaya neden olduğuna dikkat çekmişlerdi (10). Oğuz ve arkadaşlarının çalışmasında, BS alt gruplarının kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılması, belirlenen farklı ifadeye sahip gen sayılarında büyük ölçüde bir artışla sonuçlanmıştı ($p \leq 0{,}05$, FC$\geq$2,0, B x K için 4, M x K için 5, O x K için 151, V x K için 274) (10). Birlikte ele alındıklarında bu iki bulgu, BS olgularının farklı hastalık öbeklerinde, seçilmiş bazı farklı ifadeye sahip genler için birbirlerine zıt yönde değişiklikler gösterdiğine işaret etmektedir. Birbirleriyle çelişkili görülen immünolojik bulgular, BS ile ilgili literatürde daha önce de dikkat çekmişti (örneğin, artmış, normal ya da azalmış nötrofil fonksiyonları) (41).

Sınıf karşılaştırması analizlerinde, p için $\leq 0{,}05$ ve FC için $\geq 1{,}5$ seçilmesi ile BS hastalık öbekleri ile kontrol grubu arasında farklı ifadeye sahip olduğu gösterilen gen listelerinin (Çizelge 5.4.) incelenmesi sırasında, *IFI27* ve *CLEC12A* isimli iki gen dikkat çekmektedir. *IFI27* ve *CLEC12A*'ya ait sınıf karşılaştırması analizlerinde ulaşılan FC değerleri Çizelge 6.2.'de bir kez daha gösterilmiştir. Bir sonraki basamakta, farklı ifadeye sahip gen setleri kullanılarak gerçekleştirilen "Venn" analizinde, 3 karşılaştırma kümesine ait kesişim kümesinde de (M x K $\cap$ O x K $\cap$ V x K) beraberce yer aldıkları belirlenen bu iki gen (Şekil 5.1.), fonksiyonel açıdan incelendiklerinde, BS patogenezi için önem taşıyor olabilecekleri görülmektedir. Burada alfabetik sırayla önce *CLEC12A* ve sonra *IFI27* üzerinde durularak, literatür bilgileri eşliğinde, BS patogenezindeki olası rolleri tartışılacaktır.

Çizelge 6.2. *IFI27* ve *CLEC12A* genlerine ait sınıf karşılaştırması analizlerinde ulaşılan FC değerleri

Gen / Sınıf Karşılaştırması	M x K	O x K	V x K	Açıklama
IFI27	3,49	2,14	4,34	İlk sınıfta (örneğin, M) ikinci sınıfa (örneğin, K) oranla ifade artışı
CLEC12A	-3,17	-2,78	-2,35	İlk sınıfta (örneğin, M) ikinci sınıfa (örneğin, K) oranla ifade azalışı

K, kontrol grubu; M, mukokütan Behçet sendromlu olguların grubu; O, oküler Behçet sendromlu olguların grubu; V, vasküler Behçet sendromlu olguların grubu.

CLEC12A (diğer isimleriyle *MICL, KLRL1, CD371*) C-tipi lektin benzeri reseptörler ailesine ait, granülosit, monosit / makrofaj ve NK lenfositlerin yüzeyinde ifade edilerek inhibitor fonksiyon gösteren, bir doğal bağışıklık yanıtı reseptörüdür (134,135). Öyle görünmektedir ki *CLEC12A* inhibitor etkisini, sitoplazmik yüzünde sahip olduğu immünoreseptör tirozin bazlı inhibitor motif (ITIM) aracılığı ile sergilemektedir (134,135). Endojen ligandı / ligandlarından birisi olarak ürik asit kristallerinin gösterilmiş olduğu *CLEC12A*'nın, özellikle doku zedelenmesi varlığında, inflamatuvar reaksiyonun şiddetini azaltarak bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde ve homeostazisin sağlanmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (136–138). Dikkat çekici önemli bir bulgu olarak, kolşisin ismiyle bilinen ve günümüzde BS, gut ve Ailevi Akdeniz Ateşi'nin tedavisinde kullanılan anti-enflamatuvar ajanın, *CLEC12A* ifadesi üzerinde arttırıcı yönde etki gösterdiği bildirilmiştir (139). Bu bulgulara ilave olarak romatoid artrit durumunda yapılan çalışmalarda, *CLEC12A* fonksiyon kaybı ya da ifade azalmasının, hastalık aktivitesi ve enflamasyon şiddeti artışı ile ilgili olduğu da ortaya konmuştur (140–142). Oğuz ve arkadaşları, *CLEC12A* ile ilgili literatürde yer alan bulguları toplayarak ve henüz sürdürüyor oldukları çalışmalarının ön analizleri sırasında belirledikleri Türk BS olgularındaki azalmış *CLEC12A* ifadesinden hareket ederek, *CLEC12A*'nın BS ve gut gelişiminde ortak bir payda olabileceğini öne sürmüşlerdir (143). Araştırmacılar söz konusu hipotezlerini desteklemek üzere, [1] *CLEC12A* ifadesindeki azalmanın hiperenflamatuvar yanıtlarla olan ilişkisini, [2] bazı enflamatuvar hastalıklar durumunda belirlenen, fonksiyonel ve klinik etkilere sahip *CLEC12A* polimorfizmlerini, [3] BS ve gut tedavisinde ortak olarak kullanılan kolşisini, [4] hem BS hem de gut olgularında ürik asit kristallerine karşı belirlenen abartılı enflamatuvar yanıtı, [5] BS ile ilgili genom boyu ilişkilendirme ve bağlantı çalışmalarında, *CLEC12A* genomik lokusu olan 12p12-13 bölgesine işaret edilmiş olmasını ve [6] BS olguları durumunda belirlemiş oldukları, azalmış *CLEC12A* ifade düzeyi bulgusunu kullanmışlardır (143). Hipotez yazılarının sonunda Oğuz ve arkadaşları, iyi tasarlanmış çalışmalarla *CLEC12A* ile ilgili hipotezlerinin kanıtlanması durumunda, BS ve gut ile ilgili olarak tedavi, hayvan modeli geliştirilmesi ve patogenez aydınlatılması başlıklarında mesafe kat edilebileceğini ifade etmişlerdir (143). Daha güncel bir derleme yazısında Elise Chiffoleau isimli Fransız araştırmacı, aralarında *CLEC12A*'nın da bulunduğu C-tipi lektin benzeri reseptörlerin, steril enflamasyonun düzenlenmesinde önemli görevler üstlenerek potansiyel tedavi hedefleri olabileceklerini vurgulamıştır (144). Burada vurgulanmasının doğru olacağı önemli bir nokta, *CLEC12A*'nın, çalışmamıza ait ifade azalması gösteren gen listelerinde en büyük FC

değerleri ile en üst sıralarda yer aldığı bilgisidir. Mukokütan BS olguları ile kontrol grubu karşılaştırmasında *CLEC12A* 6. sırada (FC: -3,17), oküler BS olguları ile kontrol grubu karşılaştırmasında ise *CLEC12A* 1. sırada (FC: -2,78) yer almaktadır (Çizelge 5.4.). Eğer mukokütan BS olguları grubunda 1/7 ve kontrol grubunda 10/5 olarak bulunan erkek/kadın oranları (Çizelge 5.1.) ve bu grupların karşılaştırmasına ait ifade azalması gösteren gen listesindeki ilk 5 genin, Y kromozomuna ait *RPS4Y1*, *EIF1AY*, *DDX3Y*, *TXLNGY* ve *KDM5D* genleri olduğu hatırlanırsa, *CLEC12A*'nın bu sınıf karşılaştırmasında da en belirgin ifade azalması gösteren gen olduğu ortaya çıkmaktadır (Çizelge 5.4.). Özet bir şekilde sunulmaya çalışılan tüm bu bulgular, Türk BS olgularına ait farklı hastalık öbeklerinde ortak olarak belirlenen *CLEC12A* ifade azalmasının, BS durumunda varlığı iyi bilinen şiddetlenmiş nötrofil fonksiyonlarının ve abartılı doğal bağışıklık yanıtının gelişiminde rolü olabileceğini destekler niteliktedir.

IFI27 (diğer isimleriyle *P27, ISG12, FAM14D*) interferon ile uyarılan genler (ISG) grubunda yer alan ve interferonların antiviral, immünomodülatör ve antiproliferatif etkilerine aracılık eden genlerden birisidir (145). İlk tanımlandıkları yıllarda güçlü antiviral etkileri nedeniyle virüslere karşı doğal bağışıklık yanıtının önemli bir bileşeni olduklarına inanılan interferon molekülleri ve onların biyolojik etkilerine aracılık sağlayan interferon ile uyarılan genler, günümüzde hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde fonksiyon görüyor olarak değerlendirilmekte ve her iki bağışıklık sistemi arasındaki güçlü iletişim ve yakın işbirliğinin gelişiminde önemli rollere sahip oldukları düşünülmektedir (146,147). Literatürde, aralarında enflamatuvar barsak hastalıkları, psöriasis, sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, antifosfolipid sendromu, akut "graft-versus-host" hastalığı, immün trombositopenik purpura, Aicardi-Goutieres sendromu ve Kikuchi-Fujimoto hastalığının da bulunduğu çok sayıdaki immünolojik/enflamatuvar sorun durumunda *IFI27* ifadesinde önemli artışlar bulunduğu bildirilmiştir (148–158). Bahsi geçen bu enflamatuvar sorunlardan bir kısmının (enflamatuvar barsak hastalıkları, psöriasis ve sistemik lupus eritematozus) BS ile bir kesişime sahip oldukları da iyi bilinmektedir (159–161). Çalışmamıza ait sınıf karşılaştırması analizlerinde *IFI27* için belirlenen FC değerlerinin, dikkat çekici bir şekilde, ilgili gen listelerinde yine en üst sıralarda yer aldıkları görülmektedir (M x K için FC: 3,49 ile 2. sırada, O x K için FC: 2,14 ile 2. sırada ve V x K için FC: 4,34 ile 3. sırada) (Çizelge 5.4.). Burada yine karşılaştırılan sınıflar arasındaki erkek/kadın oranı farkından kaynaklandığı değerlendirilen *XIST* geni, M x K gen listesinden çıkartılırsa, *IFI27* aynı gen listesinde en yüksek FC değeriyle 1. sıraya

yükselmektedir (Çizelge 5.4.). Okuzaki ve ark. tarafından BS durumunda gerçekleştirilen genom boyu ifade çalışmasında, dikkat çekici bir bulgu olarak *IFI27*, ifadesi azalan genler arasında yer almaktaydı (129). Artmış *IFI27* ifadesinin enflamatuvar sorunlarla birlikteliği sık olarak dökümante edilmiş olsa da söz konusu durumun hangi mekanizmalarla geliştiği, burada *IFI27*'nin direkt bir rol mü oynadığı ya da sadece, aralarında interferon moleküllerinin de bulunduğu bir doğal bağışıklık enflamatuvar sitokin uyarısının belirleyicisinden mi ibaret olduğu halen açıklamaya muhtaç görülmektedir.

Mukokütan BS grubunda olmasa da oküler ve vasküler BS gruplarının kontrol grubu ile yapılan sınıf karşılaştırmalarında dikkat çeken bir diğer gen de *CLC*'dir. Çizelge 5.4.'de görüldüğü gibi *CLC*, azalan ifadeye sahip gen listelerinde, O x K için FC: -2,57 ile 2. sırada ve V x K için FC: -3,57 ile 7. sırada yer almaktadır. *CLC* (diğer isimleriyle *GAL10*, *LGALS10*) tarihsel olarak insan eozinofil lökositlerinin önemli bir bileşeni olarak tanımlanmış ve ismini de eozinofilik enflamasyon bölgelerinde sıkça belirlenen Charcot-Leyden kristallerinden almıştır (162). Uzun bir süre lizofosfolipaz fonksiyonu barındırdığı düşünülen *CLC* günümüzde galektin (lektin) gen ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmektedir (163). Primer karbohidrat afinitesinin mannoz için söz konusu olduğu gösterilen *CLC*'nin enflamasyon ve tümörlere karşı bağışıklık sistemi gözetiminde rol aldığı bilinmektedir (164,165). Kubach ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çok iyi tasarlanmış bir çalışma, *CLC* için sürpriz olarak da karşılanan çok önemli bir yeni fonksiyonu ortaya koymuştur (166). Kubach ve arkadaşlarının çalışma bulgularına göre *CLC*, CD4+CD25+ düzenleyici T lenfosit sitoplazmasında yüksek düzeyde ifade edilmekte ve bu ifade, düzenleyici T lenfositlerin adaptif bağışıklık yanıtını baskılayıcı fonksiyonları için zorunlu görünmektedir (166). Çalışmada, *CLC*'nin düzenleyici T lenfosit sitoplazmasında spesifik inhibisyonu, düzenleyici T lenfosit baskılayıcı fonksiyonunda kayıpla sonuçlanmıştır (166). Lingblom ve arkadaşları daha da güncel bir çalışmada, CD16+ (yüksek ifade) eozinofil lökosit popülasyonunun, *CLC* aracılığı ile T lenfosit fonksiyonlarını baskıladığını göstermişlerdir (167). Bulgular, *CLEC12A* ve *IFI27*'ye ilaveten *CLC*'nin de [1] BS için karakteristik hiperenflamatuvar bulguların ortaya çıkışında ve [2] özellikle de oküler ve vasküler BS olgularında sahneye eklenen adaptif bağışıklık yanıtının gelişmesinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Oğuz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada işaret edilen *CD69* ve *TNFAIP3* isimli genler ile çalışmamızda dikkat çeken *CLEC12A* ve *CLC* genleri arasındaki anolojiye değinmek faydalı olacaktır. *CD69*, *CLEC12A* ve *CLC*'ye benzer şekilde, bir C tipi lektin

reseptörüdür. İlk tanımlandığı dönemde bir aktivasyon belirleyicisi olduğu düşünülen *CD69*'un, güncel çalışmalarda önemli bir enflamasyon baskılayıcı fonksiyona sahip olduğu ortaya konmuştur (168–170). *TNFAIP3* ise, NF-kappa B aktivasyonunu inhibe ederek güçlü bir antienflamatuvar etki gösteren A20 isimli proteini kodlayan gendir (171). Zhou ve arkadaşları, *TNFAIP3* genine ait fonksiyon kaybı mutasyonlarının neden olduğu A20 haplo-yetersizlik durumunun, ailevi, çok erken yaşta başlayan ve BS'ye büyük benzerlik gösteren bir multisistemik enflamatuvar hastalığa yol açtığını göstermişlerdir (172). Oğuz ve arkadaşlarının çalışmasında, önemli antienflamatuvar fonksiyona sahip *CD69* ve *TNFAIP3* genlerinin birliktelik gösteren azalmış ifadelerinin, BS'nin ağır hastalık formu olarak kabul edilen vasküler BS ile eşliğine işaret edilmişti (10). Benzer bir şekilde çalışmamızda da antienflamatuvar fonksiyona sahip *CLEC12A* ve *CLC* genlerinin, oküler ve vasküler BS gruplarında birlikte azalmış ifade gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 5.4.).

Behçet sendromu hastalık öbeklerinden hangisi söz konusu olursa olsun, mukokütan bulgular (tekrarlayıcı oral ve genital ülserler, enflamatuvar deri lezyonları, pozitif paterji testi) BS olgularında ortak olarak belirlenmektedir (173). Bu durum, BS hastalık öbekleri arasında ortak/paylaşılmış bir patogenetik bileşen bulunması ihtimalini güçlendirmektedir. Çalışmamızda sınıf karşılaştırması gen listeleri üzerinde gerçekleştirilen "Venn" analizi, BS hastalık öbeklerinin kesişim kümesinde, yukarıda üzerlerinde durulmuş olan *CLEC12A* ve *IFI27* isimli genlerin bulunduğunu göstermişti (Şekil 5.1.). Oral ve genital bölgelerle deri yüzeyinin kendilerine mahsus yoğun bir mikrobiyal florasının bulunduğu, bu yüzeylerde oluşan mikrobiyal ihlallerin öncelikle doğal bağışıklık sistemine ait bileşenlerle (örneğin nötrofil lökositler) kontrol edilmeye çalışıldığı ve *CLEC12A* ile *IFI27*'nin doğal bağışıklık yanıtının oluşması ve düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünüldüğünde, her iki genin BS hastalık öbekleri kesişim kümesinde yer almaları anlam kazanmaktadır. Oğuz ve arkadaşları, kendi yaptıkları çalışmada da benzer bir "Venn" analizi gerçekleştirmiş ve BS hastalık öbeklerinin kesişim kümesini boş olarak bularak, bu bulgularını, BS hastalık öbekleri arasındaki moleküler düzeydeki heterojeniteye dair önemli bir kanıt olarak sunmuşlardı (10).

Çalışmamızda BS olguları ile gerçekleştirilen kümeleme analizlerine ait sonuçlar, aynı olguların klinik özelliklerine göre yapılan gruplandırılmaları ile büyük bir uyum içinde idi (Şekil 5.2.). Kümeleme analizleri için seçilen önem seviyeleri (M x O için ≤0,01, M x V, O x V ve M x O x V için ≤0,001) ve kümelemenin başarısı, farklı hastalık öbekleri

durumunda, BS olguları arasında moleküler düzeyde belirlenen heterojenite için ek bir kanıt sağlamıştır. Oküler ve vasküler BS olguları ile yapılan kümeleme analizi sırasında, "V8" örnek isimli olgunun uyumsuz görünen kümelenmesi için açıklama, bu olgunun değerlendirme anına kadar geçen hastalık süresi içinde henüz oküler bir tutulum yaşamamış olsa da gelecekte gelişebilecek bir göz tutulumu açısından artmış risk taşıdığı şeklinde yapılabilir (Şekil 5.2., [A]). Mukokütan, oküler ve vasküler BS olgularının bir arada gerçekleştirilen kümeleme analizinde vasküler BS olguları, mukokütan ve oküler BS olgularından başarılı bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 5.2., [D]). Bununla birlikte mukokütan ve oküler BS olgularının kendi içlerindeki ayrımları mükemmel olarak gerçekleşmemiştir (Şekil 5.2., [D]). Söz konusu bulgunun olası açıklaması [1] mukokütan ve oküler BS olgularının moleküler düzeyde birbirlerine göreceli olarak daha çok benzemeleri (sınıf karşılaştırması analizlerinde farklı ifadeye sahip gen sayıları M x O için 6, M x V için 324 ve O x V için 142, $p \leq 0{,}05$ ve FC$\geq$2,0 [Çizelge 5.3.]) ve [2] "M8", "O1" ve "O5" örnek isimli olgular erkek bireyler iken, diğer tüm mukokütan ve oküler BS olgularının kadın bireyler olması ile yapılabilir (Şekil 5.2., [D]).

Çalışmamızda spesifik olarak "Biyolojik Süreç" alt başlığı üzerinde odaklanan GO terimleri zenginleşme analizleri, değişik BS hastalık öbekleri durumunda birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Çizelge 5.5.'de de yer aldığı gibi, mukokütan BS olgularında "Tip I interferon sinyal yolağı", "Pıhtılaşma" ve "Yaralanmaya yanıt" başlıklı GO kategorileri önem kazanmıştı. Burada dikkat çeken, BS hastalık spektrumunun en "hafif" ucunda yer alan ve BS'nin en ılımlı formu kabul edilen mukokütan olgularda, doğal bağışıklık dışında adaptif bağışıklığa ait süreçlerin önemli bir zenginleşme göstermemiş olmasıdır. Günümüzde BS, çok sayıda kaynakta da ifade edildiği gibi, doğal bağışıklık yanıtını ilgilendiren bir anormallik sonucu başlayan ve adaptif bağışıklık yanıtlarının eklenmesi ile uzatılarak sürdürülen bir enflamatuvar sorun olarak tanımlanmaktadır (174). Söz konusu bulgumuz ile uyumlu olacak şekilde, genom boyu ifade analizi ile BS olgularının değerlendirildiği önceki iki çalışmada da IFN sinyali aktivasyonuna ait bulgular bildirilmiştir (128,130). İnterferon sinyal yolağındaki aktivasyonla ilgili olarak ifadesinin artmış olduğunu düşündüğümüz *IFI27*, bizim çalışmamızda, mukokütan BS grubu dışında oküler ve vasküler BS gruplarında da ifade artışı gösteren ilk 15 gen arasında yer almaktaydı (Çizelge 5.4.). Söz konusu bulguya rağmen, oküler ve vasküler BS gruplarında beklenen şekilde interferon sinyal yolağı ile ilgili ön plana çıkarak dikkat çeken bir zenginleşme bulgusuna rastlanmamış olması, oküler ve vasküler BS olgularında önemlerini

arttırarak baskın hale gelen adaptif bağışıklık yanıtları ile ilgili olabilir. Pıhtılaşma başlığı, mukokütan BS grubunda dikkat çeken ve üzerinde durulması gereken bir başka GO kategorisi idi. Uyumlu bir şekilde Puccetti ve ark. da çalışmalarında, "Pıhtılaşma" kategorisini zenginleşen kategoriler arasında göstermişlerdi (128). Behçet sendromu olgularında gözlenen protrombotik durum, literatürde gayet iyi tanımlanmış olmasına rağmen, muhtemel gelişim mekanizmaları halen açıklama beklemektedir (175). Günümüzde, nötrofil lökositlerin NET oluşumuna yol açarak BS trombozlarını ortaya çıkarabilecekleri olasılığı üzerinde giderek daha kuvvetle durulmaktadır (49,176). Çalışmamızda, mukokütan BS olgularında zenginleşme gösteren "Pıhtılaşma", "Kan pıhtılaşması" ve "Hemostaz" başlıklı GO kategorilerinde yer alan genler incelendiğinde, (alfabetik sırayla) *C1QBP*, *F13A1*, *H3F3A*, *ITGA2B* ve *TREML1* isimli genlerin mevcudiyeti belirlenmektedir (EK 7, GO Zenginleşme Analizleri Bulguları). Bu genlerden en az üçü (*H3F3A*, *ITGA2B* ve *TREML1*), bugün için, NET oluşumunda rol oynayan genler arasında raporlanmıştır (177,178). Behçet sendromu hastalık spektrumunun en "hafif" ucunda yer aldığı düşünülen mukokütan BS olguları durumunda dahi, NET oluşumuna ve eşlik edebilecek "immünotromboz" gelişimine ilişkin bulguların varlığı, BS'ye ait iyi bilinen protrombotik durumun gelişimine ışık tutabilir kanaatindeyiz. Son olarak, mukokütan BS olgularımızda zenginleşme gösteren bir diğer GO kategorisi ise "Yaralanmaya yanıt" idi. Mukokütan BS olgularında, özellikle oral ve genital bölgelerde mukozal yüzeye ait lezyonların sık sık tekrarlıyor olması, bu GO kategorisindeki zenginleşmeyi anlaşılır hale getirmektedir. Diğer taraftan, yukarıda da değinildiği gibi, oküler ve vasküler BS gruplarında "İmmün yanıt", "Lökosit göçü" ve "Lökosit aktivasyonu" şeklindeki bağışıklık yanıtını genel olarak ilgilendiren GO kategorileri yanında, "Adaptif immün yanıt", "Lenfosit aktivasyonu", "IL-2 üretiminin düzenlenmesi", "Lenfosit farklılaşması" ve "T hücresi aracılıklı immünite" gibi adaptif bağışıklık yanıtını spesifik olarak ilgilendiren GO kategorileri de zenginleşme göstermiştir (Çizelge 5.5.). Doku zedelenmesinin daha şiddetle ve uzun süreli olarak ortaya çıktığı ve BS hastalık spektrumunun göreceli olarak daha "ağır" ucunda yer aldıkları düşünülen oküler ve vasküler BS durumunda, olası çevresel mikrobiyal antijenler dışında, zedelenen "kendi" dokularında açığa çıkan yeni antijenik determinantlar da adaptif bağışıklık sistemini uyarabilme potansiyeline sahip olarak değerlendirilmektedir (179–183). Tulunay ve ark., Okuzaki ve ark. ve Puccetti ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen genom boyu ifade çalışmalarında da BS olgularında adaptif bağışıklık sistemi aktivasyonu bulunduğuna dair bulgular elde edilmiştir (128–130). Oküler ve vasküler BS gruplarına ait özet olarak

değindiğimiz GO terimleri zenginleşme analizi bulgularımız, günümüzde BS için geçerli olduğu düşünülen ve "kompleks bir genetik zemin üzerinde, çevresel (mikrobiyal) ve/veya kendi antijenlerine karşı gelişen proenflamatuvar, doğal bağışıklık orijinli bir aktivasyonun, adaptif bağışıklık yanıtlarıyla sürdürülmesi" şeklinde özetlenen patogenetik mekanizma ile uyumlu görülmektedir (41).

Tüm bilimsel çalışmalarda olduğu gibi, bulgularını sunarak tartışmaya çalıştığımız çalışmamızın da kendisine özgü sınırlamaları mevcuttur. Her şeyden önce çalışmamız sonucunda ulaştığımız bulguların, Türk BS olguları için geçerli olmak üzere değerlendirilmesi ve yorumlanması doğru olacaktır. Zaman zaman organ fonksiyonlarının, zaman zaman ise yaşamın tehdit altında olabildiği BS olgularında, önemli etik kaygılar nedeniyle, devam edilmekte olan ilaç tedavi şemalarının değiştirilmeden sürdürülmüş olması çalışmamıza ait bir başka sınırlama olarak değerlendirilmektedir. Mukokütan, oküler ve vasküler BS gruplarımızdaki göreceli olarak sınırlı olgu sayıları (sırasıyla n=8, n=5 ve n=9) dışında, daha nadir olarak belirlenen ve aralarında eklem, gastrointestinal sistem ve SSS tutulumları olan BS olgularının, çalışmamızda temsil edilmemiş olması da sınırlamalarımız arasında yer almaktadır. Bu nedenle, yeni tanı alarak henüz ilaç tedavisine başlanmamış naif BS olgularının dahil edileceği büyük örneklem sayılı gen ifadesi çalışmalarının yararlı olacağı düşünülmektedir. Mikrodizin verilerine ait bulgularımızın geçerli kılma deneyleri qRT-PCR ile yapılmış olsa da, çalışmamıza ait bulguların, Türk BS olgularının oluşturduğu bir başka popülasyon üzerinde de valide edilmeye çalışılması büyük önem taşımaktadır.

Türk BS olguları ile uyumlu seçilmiş bir kontrol grubu üzerinde gerçekleştirdiğimiz karşılaştırmalı genom boyu ifade analizi çalışmamız, BS'nin muhtemel immünopatogenezi ve gelecekte BS'yi konu alarak moleküler düzeyde planlanacak çalışmaların tasarımı ile ilgili olarak, önem taşıdığını düşündüğümüz bulgular ortaya koymuştur. Farklı klinik özellikler sergileyen, bir başka ifade ile farklı BS hastalık öbeklerine ait BS olgularının tek bir hasta grubu olarak değerlendirilmesi ve beraberce incelenmeleri, moleküler düzeyde önemli bilgi kaybına yol açıyor olarak görülmektedir. Söz konusu durumun, özellikle mukokütan ve oküler BS olguları ile vasküler BS olguları arasında mevcut olan önemli gen ifadesi farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. *CLEC12A*, *IFI27* ve *CLC* isimli doğal bağışıklık genlerine ait ifade değişiklikleri, enflamatuvar yanıtı belirgin olarak şiddetlendirecek yönde etkide bulunarak, Türk BS olgularında patogenezde etkili olmaktadır. Doğal ve adaptif bağışıklık yanıtlarının immünopatogenetik sürece göreceli

katkıları, değişik BS hastalık öbekleri durumunda farklılıklar göstermektedir. Kısaca değindiğimiz çalışma bulgularımız, gelecekte planlanacak BS araştırmalarında BS'nin immünogenetik heterojenitesinin hesaba katılması zorunluluğuna işaret etmektedir. *CLEC12A* ve *CLC* isimli, enflamatuvar yanıtı baskılayarak bağışıklık yanıtlarının kontrol altında tutulmasını sağlayan iki antienflamatuvar etkili gen, BS'de geliştirilecek moleküler tedavi ajanları için hedef olabilirler. Aynı genlerin tek tek ya da birlikte susturulmaları da henüz ideal bir deney hayvanı modeli bulunmayan BS için potansiyel taşıyabilir.

KAYNAKLAR

1. Behçet H, Matteson EL. On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 28(4 Suppl 60):S2-5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868561

2. Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR. Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. Tissue Antigens [Internet]. 1999 Sep;54(3):213–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519357

3. Azizlerli G, Köse AA, Sarica R, Gül A, Tutkun IT, Kulaç M, et al. Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. Int J Dermatol [Internet]. 2003 Oct;42(10):803–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521694

4. Keino H, Okada AA. Behçet's disease: global epidemiology of an Old Silk Road disease. Br J Ophthalmol [Internet]. 2007 Dec;91(12):1573–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024803

5. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N, Ozyazgan Y, Mat C, Hamuryudan V, et al. The long-term mortality and morbidity of Behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2003 Jan;82(1):60–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544711

6. Saadoun D, Wechsler B, Desseaux K, Le Thi Huong D, Amoura Z, Resche-Rigon M, et al. Mortality in Behçet's disease. Arthritis Rheum [Internet]. 2010 Sep;62(9):2806–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496419

7. Savey L, Resche-Rigon M, Wechsler B, Comarmond C, Piette JC, Cacoub P, et al. Ethnicity and association with disease manifestations and mortality in Behçet's disease. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2014 Mar 27;9:42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24674137

8. Thomas T, Chandan JS, Subramanian A, Gokhale K, Gkoutos G, Harper L, et al. Epidemiology, morbidity and mortality in Behçet's disease: a cohort study using The Health Improvement Network (THIN). Rheumatology (Oxford) [Internet]. 2020;59(10):2785–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32040196

9. Gül A. Pathogenesis of Behçet's disease: autoinflammatory features and beyond. Semin Immunopathol [Internet]. 2015 Jul;37(4):413–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068404

10. Oğuz AK, Yılmaz ST, Oygür ÇŞ, Çandar T, Sayın I, Kılıçoğlu SS, et al. Behçet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study. PLoS One [Internet]. 2016;11(2):e0149052. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26890122

11. Forrest ARR, Carninci P. Whole genome transcriptome analysis. RNA Biol [Internet]. 6(2):107–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875928

12. Saylan T. Life story of Dr. Hulusi Behçet. Yonsei Med J [Internet]. 1997 Dec;38(6):327–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9509901

13. Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. Cell [Internet]. 2010 Mar 19;140(6):784–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303869

14. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Arthritis Rheum [Internet]. 2013 Jan;65(1):1–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045170

15. Yazici H. Behçet Syndrome as a Construct. Turkish J Med Sci [Internet]. 2020;50(SI-2):1585–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32222123

16. Bettiol A, Prisco D, Emmi G. Behçet: the syndrome. Rheumatology (Oxford) [Internet]. 2020;59(Suppl 3):iii101–7. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32348523

17. Madanat WY, Alawneh KM, Smadi MM, Saadeh SS, Omari MM, Bani Hani AB, et al. The prevalence of Behçet's disease in the north of Jordan: a hospital-based epidemiological survey. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 35 Suppl 1(6):51–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29224587

18. Gul A, Ohno S. HLA-B*51 and Behçet Disease. Ocul Immunol Inflamm [Internet]. 2012 Feb;20(1):37–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188278

19. Koné-Paut I. Behçet's disease in children, an overview. Pediatr Rheumatol Online J [Internet]. 2016 Feb 18;14(1):10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26887984

20. Çirkinoğlu MS, Demir S, Bilginer Y, Özen S. Behçet's disease in children: single-center experience. Turk Pediatr Ars [Internet]. 2019;54(3):179–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31619930

21. Yildiz M, Koker O, Adrovic A, Sahin S, Barut K, Kasapcopur O. Pediatric Behçet's disease - clinical aspects and current concepts. Eur J Rheumatol [Internet]. 2020 Feb 3;7(1):38–47. Available from: https://eurjrheumatol.org//en/pediatric-behcet-s-disease-clinical-aspects-and-current-concepts-133294

22. Gül A, Inanç M, Ocal L, Aral O, Koniçe M. Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. Ann Rheum Dis [Internet]. 2000 Aug;59(8):622–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913059

23. de Menthon M, LaValley MP, Maldini C, Guillevin L, Mahr A. HLA-B51/B5 and the risk of Behçet's disease: A systematic review and meta-analysis of case-control genetic association studies. Arthritis Rheum [Internet]. 2009 Oct 15;61(10):1287–96. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/art.24642

24. Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. Nat Genet [Internet]. 2013 Feb;45(2):202–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291587

25. Ombrello MJ, Kirino Y, de Bakker PIW, Gül A, Kastner DL, Remmers EF. Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2014 Jun 17;111(24):8867–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821759

26. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. Nat Genet [Internet]. 2010 Aug;42(8):698–702. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20622878

27. Gül A. Genetics of Behçet's disease. Curr Opin Rheumatol [Internet]. 2014 Jan;26(1):56–63. Available from: https://journals.lww.com/00002281-201401000-00010

28. Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Ombrello MJ, Kirino Y, Satorius C, et al. Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behçet's disease susceptibility. Nat Genet [Internet]. 2017 Mar;49(3):438–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166214

29. Galeone M, Colucci R, D'Erme AM, Moretti S, Lotti T. Potential Infectious Etiology of Behçet's Disease. Patholog Res Int [Internet]. 2012;2012:595380. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254152

30. Greco A, De Virgilio A, Ralli M, Ciofalo A, Mancini P, Attanasio G, et al. Behçet's disease: New insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. Autoimmun Rev [Internet]. 2018 Jun;17(6):567–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29631062

31. Hooks JJ. Possibility of a viral etiology in recurrent aphthous ulcers and Behçet's syndrome. J Oral Pathol [Internet]. 1978;7(6):353–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/105094

32. Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's Disease. Eur J Dermatol [Internet]. 18(5):489–98. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18693149

33. Lehner T. The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behçet's disease. Int Rev Immunol [Internet]. 1997;14(1):21–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203024

34. Muhammad JS, Ishaq M, Ahmed K. Genetics and Epigenetics Mechanism in the Pathogenesis of Behçet's Disease. Curr Rheumatol Rev [Internet]. 2019;15(1):7–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29779484

35. Farhadi J, Nouri M, Sakhinia E, Samadi N, Babaloo Z, Alipour S, et al. Epigenetics and Behçet's Disease: DNA Methylation Specially Highlighted. Iran J Allergy Asthma Immunol [Internet]. 2019 Oct 23;18(5):462–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32245289

36. Hughes T, Ture-Ozdemir F, Alibaz-Oner F, Coit P, Direskeneli H, Sawalha AH. Epigenome-Wide Scan Identifies a Treatment-Responsive Pattern of Altered DNA Methylation Among Cytoskeletal Remodeling Genes in Monocytes and CD4+ T Cells From Patients With Behçet's Disease. Arthritis Rheumatol [Internet]. 2014 Jun;66(6):1648–58. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/art.38409

37. Consolandi C, Turroni S, Emmi G, Severgnini M, Fiori J, Peano C, et al. Behçet's syndrome patients exhibit specific microbiome signature. Autoimmun Rev [Internet]. 2015 Apr;14(4):269–76. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156899721400281X

38. Alipour S, Nouri M, Sakhinia E, Samadi N, Roshanravan N, Ghavami A, et al. Epigenetic alterations in chronic disease focusing on Behçet's disease: Review. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017 Jul;91:526–33. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217307679

39. Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behcet's disease: do we oversimplify a complex disorder? Rheumatology [Internet]. 2006 Aug 18;45(12):1461–5. Available from: https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/kel329

40. Gül A. Behçet Disease. In: Textbook of Autoinflammation [Internet]. Cham:

Springer International Publishing; 2019. p. 647–65. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-98605-0_35

41. Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G. Disease Mechanisms. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 209–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_15

42. Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gül A, Onoé K, et al. Immunology and functional genomics of Behçet's disease. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2003 Sep;60(9):1903–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523551

43. Mumcu G, Inanc N, Yavuz S, Direskeneli H. The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 25(4 Suppl 45):S27-33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949548

44. Michailidou D, Mustelin T, Lood C. Role of Neutrophils in Systemic Vasculitides. Front Immunol [Internet]. 2020;11:619705. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33391289

45. Perazzio SF, Andrade LEC, de Souza AWS. Understanding Behçet's Disease in the Context of Innate Immunity Activation. Front Immunol [Internet]. 2020;11:586558. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33193413

46. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, et al. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. J Rheumatol [Internet]. 1993 Sep;20(9):1544–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8164212

47. Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Neutrophil activation in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 19(5 Suppl 24):S19-24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11760393

48. Takeno M, Kariyone A, Yamashita N, Takiguchi M, Mizushima Y, Kaneoka H, et

al. Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. Arthritis Rheum [Internet]. 1995 Mar;38(3):426–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7880197

49. Safi R, Kallas R, Bardawil T, Mehanna CJ, Abbas O, Hamam R, et al. Neutrophils contribute to vasculitis by increased release of neutrophil extracellular traps in Behçet's disease. J Dermatol Sci [Internet]. 2018 Nov;92(2):143–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30237006

50. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. Thromb Res [Internet]. 2018;170:87–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30138777

51. Vandereyken M, James OJ, Swamy M. Mechanisms of activation of innate-like intraepithelial T lymphocytes. Mucosal Immunol [Internet]. 2020;13(5):721–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32415229

52. Hasan MS, Bergmeier LA, Petrushkin H, Fortune F. Gamma Delta (γδ) T Cells and Their Involvement in Behçet's Disease. J Immunol Res [Internet]. 2015;2015:705831. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539557

53. Freysdottir J, Hussain L, Farmer I, Lau S-H, Fortune F. Diversity of gammadelta T cells in patients with Behcet's disease is indicative of polyclonal activation. Oral Dis [Internet]. 2006 May;12(3):271–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700735

54. Ergun T, Ince U, Ekşioğlu-Demiralp E, Direskeneli H, Gürbüz O, Gürses L, et al. HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behçet's disease. J Am Acad Dermatol [Internet]. 2001 Dec;45(6):904–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712037

55. Deniz R, Tulunay-Virlan A, Ture Ozdemir F, Unal AU, Ozen G, Alibaz-Oner F, et al. Th17-Inducing Conditions Lead to in vitro Activation of Both Th17 and Th1 Responses in Behcet's Disease. Immunol Invest [Internet]. 2017 Jul;46(5):518–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414558

56. Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu R, Adachi K, Miura Y, Nakane A, et al. Natural killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behcet's disease. Br J Dermatol [Internet]. 1985 Sep;113(3):313–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4063167

57. Hamzaoui K, Ayed K, Hamza M, Touraine JL. Natural killer cells in Behçet's disease. Clin Exp Immunol [Internet]. 1988 Jan;71(1):126–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258201

58. Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, et al. Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behçet's disease. Arthritis Res Ther [Internet]. 2010;12(3):R80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459787

59. Kucuksezer UC, Aktas-Cetin E, Bilgic-Gazioglu S, Tugal-Tutkun I, Gül A, Deniz G. Natural killer cells dominate a Th-1 polarized response in Behçet's disease patients with uveitis. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 33(6 Suppl 94):S24-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25937098

60. Esin S, Gül A, Hodara V, Jeddi-Tehrani M, Dilsen N, Koniçe M, et al. Peripheral blood T cell expansions in patients with Behcet's disease. Clin Exp Immunol [Internet]. 1997 Mar;107(3):520–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067527

61. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Oligoclonal T cell expansions in patients with Behçet's disease. Clin Exp Immunol [Internet]. 1999 Jul;117(1):166–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403931

62. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. Arthritis Rheum [Internet]. 1999 Sep;42(9):1967–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10513814

63. Lew W, Chang JY, Jung JY, Bang D. Increased expression of interleukin-23 p19 mRNA in erythema nodosum-like lesions of Behçet's disease. Br J Dermatol [Internet]. 2008 Mar;158(3):505–11. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205865

64. Nara K, Kurokawa MS, Chiba S, Yoshikawa H, Tsukikawa S, Matsuda T, et al. Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. Clin Exp Immunol [Internet]. 2008 May;152(2):245–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336589

65. Romagnani S. Human Th17 cells. Arthritis Res Ther [Internet]. 2008;10(2):206. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18466633

66. Lightman S, Taylor SRJ, Bunce C, Longhurst H, Lynn W, Moots R, et al. Pegylated interferon-α-2b reduces corticosteroid requirement in patients with Behçet's disease with upregulation of circulating regulatory T cells and reduction of Th17. Ann Rheum Dis [Internet]. 2015 Jun;74(6):1138–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269831

67. Nanke Y, Yago T, Kotake S. The Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Behcet's Disease. J Clin Med [Internet]. 2017 Jul 21;6(7). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28753995

68. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. Scand J Rheumatol [Internet]. 2002;31(4):205–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369651

69. McGonagle D, Aydin SZ, Gül A, Mahr A, Direskeneli H. 'MHC-I-opathy'-unified concept for spondyloarthritis and Behçet disease. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2015;11(12):731–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526644

70. Wildner G, Thurau SR. Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease. Eur J Immunol [Internet]. 1994 Nov;24(11):2579–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957552

71. Baum H, Davies H, Peakman M. Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? Immunol Today [Internet]. 1996 Feb;17(2):64–70. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808052

72. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Houman H. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 24(5 Suppl 42):S71-8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067431

73. Nanke Y, Kotake S, Goto M, Ujihara H, Matsubara M, Kamatani N. Decreased percentages of regulatory T cells in peripheral blood of patients with Behcet's disease before ocular attack: a possible predictive marker of ocular attack. Mod Rheumatol [Internet]. 2008;18(4):354–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427720

74. Hamzaoui K. Paradoxical high regulatory T cell activity in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 25(4 Suppl 45):S107-13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949563

75. Yazici H. The Place of Behçet's Syndrome Among the Autoimmune Diseases. Int Rev Immunol [Internet]. 1997 Jan 10;14(1):1–10. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08830189709116840

76. Ekşioglu-Demiralp E, Kibaroglu A, Direskeneli H, Yavuz S, Karsli F, Yurdakul S, et al. Phenotypic characteristics of B cells in Behçet's disease: increased activity in B cell subsets. J Rheumatol [Internet]. 1999 Apr;26(4):826–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229403

77. Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G. The role of heat shock proteins in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol [Internet]. 21(4 Suppl 30):S44-8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14727460

78. Yazici H, Seyahi E, Hatemi G, Yazici Y. Behçet syndrome: a contemporary view. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2018 Jan 24;14(2):119. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29362466

79. Alpsoy E. Behçet's disease: A comprehensive review with a focus on epidemiology, etiology and clinical features, and management of mucocutaneous lesions. J Dermatol [Internet]. 2016 Jun;43(6):620–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27075942

80. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease. Lancet (London, England) [Internet]. 1990 May 5;335(8697):1078–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1970380

81. Gürler A, Boyvat A, Türsen U. Clinical manifestations of Behçet's disease: an analysis of 2147 patients. Yonsei Med J [Internet]. 1997 Dec;38(6):423–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9509912

82. Mat MC, Goksugur N, Engin B, Yurdakul S, Yazici H. The frequency of scarring after genital ulcers in Behçet's syndrome: a prospective study. Int J Dermatol [Internet]. 2006 May;45(5):554–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700790

83. Alpsoy E, Zouboulis CC, Ehrlich GE. Mucocutaneous lesions of Behcet's disease. Yonsei Med J [Internet]. 2007 Aug 31;48(4):573–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722228

84. Kutlubay Z, Tüzün Y, Wolf R. The Pathergy Test as a Diagnostic Tool. Skinmed [Internet]. 15(2):97–104. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528602

85. Ergun T, Gürbüz O, Harvell J, Jorizzo J, White W. The histopathology of pathergy: a chronologic study of skin hyperreactivity in Behçet's disease. Int J Dermatol [Internet]. 1998 Dec;37(12):929–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888335

86. Kitaichi N, Miyazaki A, Iwata D, Ohno S, Stanford MR, Chams H. Ocular features of Behcet's disease: An international collaborative study. Br J Ophthalmol [Internet]. 2007 Dec 1;91(12):1579–82. Available from: https://bjo.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjo.2007.123554

87. Leonardo NM, McNeil J. Behcet's Disease: Is There Geographical Variation? A Review Far from the Silk Road. Int J Rheumatol [Internet]. 2015;2015:1–7. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ijr/2015/945262/

88. Ozyazgan Y, Ucar D, Hatemi G, Yazici Y. Ocular Involvement of Behçet's Syndrome: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol [Internet]. 2015

Dec;49(3):298–306. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828904

89. Tascilar K, Melikoglu M, Ugurlu S, Sut N, Caglar E, Yazici H. Vascular involvement in Behçet's syndrome: a retrospective analysis of associations and the time course. Rheumatology (Oxford) [Internet]. 2014 Nov;53(11):2018–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24907156

90. Ozguler Y, Esatoglu SN, Seyahi E, Melikoglu M. Vascular and Cardiac Involvement. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 83–103. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_7

91. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. Curr Pharm Des [Internet]. 2012;18(11):1478–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22364132

92. Saip S, Akman-Demir G, Siva A. Neuro-Behçet syndrome. Handb Clin Neurol [Internet]. 2014;121:1703–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24365442

93. Hatemi I, Esatoglu SN, Hatemi G, Erzin Y, Yazici H, Celik AF. Characteristics, Treatment, and Long-Term Outcome of Gastrointestinal Involvement in Behcet's Syndrome: A Strobe-Compliant Observational Study From a Dedicated Multidisciplinary Center. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2016 Apr;95(16):e3348. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100417

94. Yurdakul S, Yazici H, Tüzün Y, Pazarli H, Yalçin B, Altaç M, et al. The arthritis of Behçet's disease: a prospective study. Ann Rheum Dis [Internet]. 1983 Oct;42(5):505–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6625699

95. Yurdakul S, Leccese P. Locomotor System Disease. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 105–15. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_8

96. Cañete JD, Celis R, Noordenbos T, Moll C, Gómez-Puerta JA, Pizcueta P, et al.

Distinct synovial immunopathology in Behçet disease and psoriatic arthritis. Arthritis Res Ther [Internet]. 2009;11(1):R17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196489

97. Nowatzky J, Fresko İ. Miscellaneous Manifestations of Behçet Syndrome. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 143–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_10

98. Davatchi F. Diagnosis/Classification Criteria for Behcet's Disease. Patholog Res Int [Internet]. 2012;2012:607921. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961081

99. International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD). The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. J Eur Acad Dermatol Venereol [Internet]. 2014 Mar;28(3):338–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441863

100. Alibaz-Oner F, Sawalha AH, Direskeneli H. Management of Behçet's disease. Curr Opin Rheumatol [Internet]. 2018;30(3):238–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29432223

101. Fresko I, Yazici H. Treatment strategies for Behçet's disease. Expert Opin Pharmacother [Internet]. 2008 Dec;9(18):3211–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040341

102. Kötter I, Zierhut M, Eckstein AK, Vonthein R, Ness T, Günaydin I, et al. Human recombinant interferon alfa-2a for the treatment of Behçet's disease with sight threatening posterior or panuveitis. Br J Ophthalmol [Internet]. 2003 Apr;87(4):423–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642304

103. Rodríguez-Carrio J, Nucera V, Masala IF, Atzeni F. Behçet disease: From pathogenesis to novel therapeutic options. Pharmacol Res [Internet]. 2021 Apr 4;105593. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33826948

104. Calgüneri M, Ertenli I, Kiraz S, Erman M, Celik I. Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behçet's disease. Dermatology [Internet].

1996;192(2):125–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829493

105. Kaneko F, Oyama N, Nishibu A. Streptococcal infection in the pathogenesis of Behçet's disease and clinical effects of minocycline on the disease symptoms. Yonsei Med J [Internet]. 1997 Dec;38(6):444–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9509915

106. Alibaz-Oner F, Karadeniz A, Ylmaz S, Balkarl A, Kimyon G, Yazc A, et al. Behçet disease with vascular involvement: effects of different therapeutic regimens on the incidence of new relapses. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2015 Feb;94(6):e494. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25674739

107. Hatemi G, Christensen R, Bang D, Bodaghi B, Celik AF, Fortune F, et al. 2018 update of the EULAR recommendations for the management of Behçet's syndrome. Ann Rheum Dis [Internet]. 2018;77(6):808–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29625968

108. Hamuryudan V, Kötter I, Tüzün H. Disease Management. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 279–305. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_20

109. Yurdakul S. Epidemiology of Behçet Syndrome and Regional Differences in Disease Expression. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 21–35. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_3

110. Seyahi E, Saadoun D. The Prognosis of Behçet Syndrome. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 243–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_18

111. Barnes CG, Yazici Y. History and Diagnosis. In: Behçet Syndrome [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 7–20. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24131-5_2

112. Yazici H, Fresko I, Yurdakul S. Behçet's syndrome: disease manifestations, management, and advances in treatment. Nat Clin Pract Rheumatol [Internet]. 2007 Mar;3(3):148–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334337

113. Seyahi E. Phenotypes in Behçet's syndrome. Intern Emerg Med [Internet]. 2019;14(5):677–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30747365

114. Bettiol A, Hatemi G, Vannozzi L, Barilaro A, Prisco D, Emmi G. Treating the Different Phenotypes of Behçet's Syndrome. Front Immunol [Internet]. 2019;10:2830. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921115

115. Zou J, Luo J-F, Shen Y, Cai J-F, Guan J-L. Cluster analysis of phenotypes of patients with Behçet's syndrome: a large cohort study from a referral center in China. Arthritis Res Ther [Internet]. 2021;23(1):45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33514418

116. Pachot A, Blond J-L, Mougin B, Miossec P. Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. J Biotechnol [Internet]. 2004 Oct 19;114(1–2):121–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464605

117. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609

118. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics [Internet]. 2003 Apr;4(2):249–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925520

119. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1998 Dec 8;95(25):14863–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843981

120. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. Nucleic Acids Res [Internet]. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W741-8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980575

121. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit

(WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res [Internet]. 2013 Jul;41(Web Server issue):W77-83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703215

122. Karasneh J, Gül A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behçet's disease. Arthritis Rheum [Internet]. 2005 Jun;52(6):1836–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15934084

123. Meguro A, Inoko H, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Okada E, et al. Genetics of Behçet disease inside and outside the MHC. Ann Rheum Dis [Internet]. 2010 Apr;69(4):747–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684014

124. Gül A, Hajeer AH, Worthington J, Ollier WE, Silman AJ. Linkage mapping of a novel susceptibility locus for Behçet's disease to chromosome 6p22-23. Arthritis Rheum [Internet]. 2001 Nov;44(11):2693–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710725

125. Lee YJ, Horie Y, Wallace GR, Choi YS, Park JA, Choi JY, et al. Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behcet's disease. Ann Rheum Dis [Internet]. 2013 Sep 1;72(9):1510–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041938

126. Kappen JH, Medina-Gomez C, van Hagen PM, Stolk L, Estrada K, Rivadeneira F, et al. Genome-wide association study in an admixed case series reveals IL12A as a new candidate in Behçet disease. PLoS One [Internet]. 2015;10(3):e0119085. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25799145

127. Verrou K-M, Vlachogiannis NI, Ampatziadis-Michailidis G, Moulos P, Pavlopoulos GA, Hatzis P, et al. Distinct transcriptional profile of blood mononuclear cells in Behçet's disease: insights into the central role of neutrophil chemotaxis. Rheumatology [Internet]. 2021 Jan 25; Available from: https://academic.oup.com/rheumatology/advance-article/doi/10.1093/rheumatology/keab052/6119403

128. Puccetti A, Fiore PF, Pelosi A, Tinazzi E, Patuzzo G, Argentino G, et al. Gene Expression Profiling in Behcet's Disease Indicates an Autoimmune Component in the Pathogenesis of the Disease and Opens New Avenues for Targeted Therapy. J

Immunol Res [Internet]. 2018;2018:1–18. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/4246965/

129. Okuzaki D, Yoshizaki K, Tanaka T, Hirano T, Fukushima K, Washio T, et al. Microarray and whole-exome sequencing analysis of familial Behçet's disease patients. Sci Rep [Internet]. 2016 May 20;6(1):19456. Available from: http://www.nature.com/articles/srep19456

130. Tulunay A, Dozmorov MG, Ture-Ozdemir F, Yilmaz V, Eksioglu-Demiralp E, Alibaz-Oner F, et al. Activation of the JAK/STAT pathway in Behcet's disease. Genes Immun [Internet]. 2015 Mar 20;16(2):170–5. Available from: http://www.nature.com/articles/gene201464

131. Xavier JM, Krug T, Davatchi F, Shahram F, Fonseca B V., Jesus G, et al. Gene expression profiling and association studies implicate the neuregulin signaling pathway in Behçet's disease susceptibility. J Mol Med [Internet]. 2013 Aug 27;91(8):1013–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00109-013-1022-4

132. Simon RM, Dobbin K. Experimental design of DNA microarray experiments. Biotechniques [Internet]. 2003 Mar;Suppl:16–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12664680

133. Leccese P, Yazici Y, Olivieri I. Behcet's syndrome in nonendemic regions. Curr Opin Rheumatol [Internet]. 2017 Jan;29(1):12–6. Available from: https://journals.lww.com/00002281-201701000-00004

134. Marshall ASJ, Willment JA, Lin H-H, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and Characterization of a Novel Human Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like Receptor (MICL) That Is Predominantly Expressed on Granulocytes and Monocytes. J Biol Chem [Internet]. 2004 Apr;279(15):14792–802. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819638718

135. Han Y, Zhang M, Li N, Chen T, Zhang Y, Wan T, et al. KLRL1, a novel killer cell lectinlike receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity. Blood [Internet]. 2004 Nov 1;104(9):2858–66. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/104/9/2858/19372/KLRL1-a-novel-killer-

cell-lectinlike-receptor

136. Fernandes MJ, Naccache PH. The Role of Inhibitory Receptors in Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammation. Front Immunol [Internet]. 2018 Aug 20;9. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01883/full

137. Neumann K, Castiñeiras-Vilariño M, Höckendorf U, Hannesschläger N, Lemeer S, Kupka D, et al. Clec12a Is an Inhibitory Receptor for Uric Acid Crystals that Regulates Inflammation in Response to Cell Death. Immunity [Internet]. 2014 Mar;40(3):389–99. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314000697

138. Yamasaki S. Clec12a: Quieting the Dead. Immunity [Internet]. 2014 Mar;40(3):309–11. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314000806

139. Gagné V, Marois L, Levesque J-M, Galarneau H, Lahoud MH, Caminschi I, et al. Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. Arthritis Res Ther [Internet]. 2013 Jul 9;15(4):R73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837669

140. Galligan CL, Baig E, Bykerk V, Keystone EC, Fish EN. Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity. Genes Immun [Internet]. 2007 Sep;8(6):480–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568789

141. Michou L, Cornélis F, Levesque J-M, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, et al. A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis. Jt bone spine [Internet]. 2012 Oct;79(5):451–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341585

142. Redelinghuys P, Whitehead L, Augello A, Drummond RA, Levesque J-M, Vautier S, et al. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis [Internet]. 2016;75(7):1386–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26275430

143. Oğuz AK, Yılmaz S, Akar N, Özdağ H, Gürler A, Ateş A, et al. C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis. Med Hypotheses [Internet]. 2015 Aug;85(2):186–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957656

144. Chiffoleau E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. Front Immunol [Internet]. 2018 Feb 15;9. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00227/full

145. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. Annu Rev Immunol [Internet]. 2014 Mar 21;32(1):513–45. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120231

146. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. Curr Opin Immunol [Internet]. 2002 Aug;14(4):432–6. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791502003540

147. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY-N, Liu Y-J. Natural Interferon α/β–Producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity. J Exp Med [Internet]. 2000 Jul 17;192(2):219–26. Available from: https://rupress.org/jem/article/192/2/219/30015/Natural-Interferon-αβProducing-Cells-Link-Innate

148. Dooley TP, Curto E V., Reddy SP, Davis RL, Lambert GW, Wilborn TW, et al. Regulation of Gene Expression in Inflammatory Bowel Disease and Correlation with IBD Drugs. Inflamm Bowel Dis [Internet]. 2004 Jan;10(1):1–14. Available from: https://academic.oup.com/ibdjournal/article/10/1/1-14/4706149

149. Suomela S, Cao L, Bowcock A, Saarialho-Kere U. Interferon α-Inducible Protein 27 (IFI27) is Upregulated in Psoriatic Skin and Certain Epithelial Cancers. J Invest Dermatol [Internet]. 2004 Mar;122(3):717–21. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1530734X

150. Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, et al. A Non-invasive Diagnosis of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis by Means of Gene

Expression Profile Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells. J Clin Immunol [Internet]. 2013 Jul 23;33(5):1018–26. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10875-013-9897-y

151. Zhang Y, Sun Y, Gao X, Qi R. Integrated bioinformatic analysis of differentially expressed genes and signaling pathways in plaque psoriasis. Mol Med Rep [Internet]. 2019 May 15; Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10241

152. Ishii T, Onda H, Tanigawa A, Ohshima S, Fujiwara H, Mima T, et al. Isolation and Expression Profiling of Genes Upregulated in the Peripheral Blood Cells of Systemic Lupus Erythematosus Patients. DNA Res [Internet]. 2005;12(6):429–39. Available from: https://academic.oup.com/dnaresearch/article-lookup/doi/10.1093/dnares/dsi020

153. Zhao X, Zhang L, Wang J, Zhang M, Song Z, Ni B, et al. Identification of key biomarkers and immune infiltration in systemic lupus erythematosus by integrated bioinformatics analysis. J Transl Med [Internet]. 2021 Dec 19;19(1):35. Available from: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02698-x

154. KIMOTO O, SAWADA J, SHIMOYAMA K, SUZUKI D, NAKAMURA S, HAYASHI H, et al. Activation of the Interferon Pathway in Peripheral Blood of Patients with Sjögren's Syndrome. J Rheumatol [Internet]. 2011 Feb;38(2):310–6. Available from: http://www.jrheum.org/lookup/doi/10.3899/jrheum.100486

155. Ugolini-Lopes MR, Torrezan GT, Gândara APR, Olivieri EHR, Nascimento IS, Okazaki E, et al. Enhanced type I interferon gene signature in primary antiphospholipid syndrome: Association with earlier disease onset and preeclampsia. Autoimmun Rev [Internet]. 2019 Apr;18(4):393–8. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997219300394

156. Takahashi N, Sato N, Takahashi S, Tojo A. Gene-expression profiles of peripheral blood mononuclear cell subpopulations in acute graft-vs-host disease following cord blood transplantation. Exp Hematol [Internet]. 2008 Dec;36(12):1760-1770.e4. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X08003536

157. Ye Q, Jiang H, Liao X, Chen K, Li S. Identification and Validation of Gene Expression Pattern and Signature in Patients with Immune Thrombocytopenia. SLAS Discov Adv Sci Drug Discov [Internet]. 2017 Feb 27;22(2):187–95. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1087057116664029

158. He T, Xia Y, Yang J. Systemic inflammation and chronic kidney disease in a patient due to the RNASEH2B defect. Pediatr Rheumatol [Internet]. 2021 Dec 22;19(1):9. Available from: https://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-021-00497-2

159. Valenti S, Gallizzi R, De Vivo D, Romano C. Intestinal Behçet and Crohn's disease: two sides of the same coin. Pediatr Rheumatol [Internet]. 2017 Dec 20;15(1):33. Available from: http://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-017-0162-4

160. Hahn HJ, Kwak SG, Kim D-K, Kim J-Y. Association of Behçet disease with psoriasis and psoriatic arthritis. Sci Rep [Internet]. 2021 Dec 28;11(1):2531. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-021-81972-4

161. Lee WS, Kim SJ, Ahn SK. Behçet's Disease as a Part of the Symptom Complex of SLE? J Dermatol [Internet]. 1996 Mar;23(3):196–9. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1346-8138.1996.tb03997.x

162. Dvorak AM, Letourneau L, Login GR, Weller PF, Ackerman SJ. Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. Blood [Internet]. 1988 Jul;72(1):150–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2455566

163. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. J Immunol [Internet]. 1993 Jan 15;150(2):456–68. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419478

164. Swaminathan GJ, Leonidas DD, Savage MP, Ackerman SJ, Acharya KR. Selective recognition of mannose by the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein

(galectin-10): a crystallographic study at 1.8 A resolution. Biochemistry [Internet]. 1999 Oct 19;38(42):13837–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10529229

165. Liu F-T. Regulatory roles of galectins in the immune response. Int Arch Allergy Immunol [Internet]. 2005 Apr;136(4):385–400. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775687

166. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. Blood [Internet]. 2007 Sep 1;110(5):1550–8. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/110/5/1550/23725/Human-CD4CD25-regulatory-T-cells-proteome-analysis

167. Lingblom C, Andersson J, Andersson K, Wennerås C. Regulatory Eosinophils Suppress T Cells Partly through Galectin-10. J Immunol [Internet]. 2017 Jun 15;198(12):4672–81. Available from: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601005

168. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. Stem Cells [Internet]. 1994 Sep;12(5):456–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7804122

169. Yu L, Yang F, Zhang F, Guo D, Li L, Wang X, et al. CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production. Cell Death Dis [Internet]. 2018;9(9):905. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30185773

170. Sancho D, Gómez M, Viedma F, Esplugues E, Gordón-Alonso M, García-López MA, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. J Clin Invest [Internet]. 2003 Sep;112(6):872–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975472

171. Opipari AW, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. J Biol Chem [Internet].

1990 Sep 5;265(25):14705–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118515

172. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat Genet [Internet]. 2016 Jan 7;48(1):67–73. Available from: http://www.nature.com/articles/ng.3459

173. Nakamura K, Tsunemi Y, Kaneko F, Alpsoy E. Mucocutaneous Manifestations of Behçet's Disease. Front Med [Internet]. 2021 Feb 1;7. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.613432/full

174. Direskeneli H. Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. Ann Rheum Dis [Internet]. 2001 Nov;60(11):996–1002. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602462

175. Seyahi E, Yurdakul S. Behçet's Syndrome and Thrombosis. Mediterr J Hematol Infect Dis [Internet]. 2011;3(1):e2011026. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869912

176. Le Joncour A, Martos R, Loyau S, Lelay N, Dossier A, Cazes A, et al. Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behcet's disease. Ann Rheum Dis [Internet]. 2019 Sep;78(9):1274–82. Available from: https://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2018-214335

177. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgin JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol [Internet]. 2011 Jul 1;187(1):538–52. Available from: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1100450

178. Deppermann C, Kubes P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. Innate Immun [Internet]. 2018 Aug 26;24(6):335–48. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753425918789255

179. Klok AM, de Vries J, Rothova A, Zaal MJ, Schweitzer CM, Bos JD, et al. Antibodies against ocular and oral antigens in Behçet's disease associated with

uveitis. Curr Eye Res [Internet]. 1989 Sep;8(9):957–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2676357

180. Yamamoto JH, Minami M, Inaba G, Masuda K, Mochizuki M. Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behçet's disease. Br J Ophthalmol [Internet]. 1993 Sep;77(9):584–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8218058

181. de Smet MD, Dayan M. Prospective determination of T-cell responses to S-antigen in Behçet's disease patients and controls. Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet]. 2000 Oct;41(11):3480–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006242

182. Mor F, Weinberger A, Cohen IR. Identification of alpha-tropomyosin as a target self-antigen in Behçet's syndrome. Eur J Immunol [Internet]. 2002;32(2):356–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807775

183. Mahesh SP, Li Z, Buggage R, Mor F, Cohen IR, Chew EY, et al. Alpha tropomyosin as a self-antigen in patients with Behçet's disease. Clin Exp Immunol [Internet]. 2005 May;140(2):368–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807864

EKLER

EK 1 ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	Ufuk Üniversitesi Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mevlana Bulvarı No:86-88 06520 Balgat Ankara
TELEFON	312-2044217
FAKS	312-2044055
E-POSTA	

Q1"	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Behçet Hastalığının Atak Ve Remisyon Dönemlerindeki Gen İfadelerinin Mikrodizin Analizi İle Karşılaştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Ali Kemal Oğuz			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Dahiliye Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	-			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	**Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mevlana Bulvarı No:86-88 06520 Balgat Ankara**			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	**Ufuk Üniversitesi Etik Kurulu**			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI X		
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		BE/BY	☐		
		DİĞER	☐	Diğer ise belirtiniz:	
		İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	X	Belirtiniz:moleküler çalışma	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ X	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL X	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Haziran 2009		Türkçe X İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe X İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Haziran 2009		Türkçe X İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Haziran 2009	-	Türkçe X İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

Etik Kurul Değerlendirme Formu

EK 2 OLGU RAPOR FORMU

BEHÇET SENDROMU'NDA
KARŞILAŞTIRMALI GENOM BOYU İFADE ANALİZİ ÇALIŞMASI
OLGU RAPOR FORMU

HASTA ADI SOYADI: **TARİH:** / / 201

CİNSİYET: E [ ] K [ ] **YAŞ:** **TELEFON:**

BEHÇET HASTALIĞI BAŞLANGIÇ YAŞI:

ORAL AFT: (+) [ ] **GENİTAL ÜLSER:** (+) [ ] (-) [ ]

PATERJİ: (+) [ ] (-) [ ] **DERİ LEZYONLARI:** (+) [ ] (-) [ ]

GÖZ TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ]

SSS TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ] **GİS TUTULUMU:** (+) [ ] (-) [ ]

KARDİYAK TUTULUM: (+) [ ] (-) [ ] **PULMONER TUTULUM:** (+) [ ] (-) [ ]

EPİDİDİMİT: (+) [ ] (-) [ ] **KAS-İSKELET S. TUTULUMU:** (+) [ ] (-) [ ]

MAJÖR DAMAR TUTULUMU: (+) [ ] (-) [ ]

DVT: [ ] **VCS:** [ ] **VCİ:** [ ] **HEPATİK / PORTAL VEN:** [ ] **AORT:** [ ]

DEĞERLENDİRME ANINDAN ÖNCEKİ SON 2 AY İÇİNDE ORAL AFT DIŞI

TUTULUMLA KARAKTERİZE ALEVLENME (ATAK) VARLIĞI: (+) [ ] (-) [ ]

DEĞERLENDİRME ANINDA KULLANILAN İLAÇLAR

KOLŞİSİN: [ ] **DAPSON:** [ ] **TALİDOMİD:** [ ]

GLUKOKORTİKOİD: [ ] **NSAİİ:** [ ]

AZA: [ ] **CYC-A:** [ ] **CYC:** [ ] **KLORAMBUSİL:** [ ] **MTX:** [ ]

IFN-α: [ ] **SULFASALAZİN:** [ ]

ASA: [ ] **DİPRİDAMOL:** [ ] **KLOPİDOGREL:** [ ] **DMAH:** [ ] **WARFARİN:** [ ]

TNF İNHİBİTÖRÜ: [ ] **ETANERCEPT:** [ ] **INFLIXIMAB:** [ ] **ADALIMUMAB:** [ ]

DİĞER (LÜTFEN BELİRTİNİZ):

LÜTFEN ARKA SAYFAYA GEÇİNİZ →

MB1 / OB1 / VB1 / K1 ← Lütfen Her 2 Tüpün Üzerine Yazınız

Lütfen Tüpleri Tam Doldurup Karıştırınız

TOTAL KLİNİK AKTİVİTE İNDEKSİ (UYGUN ŞIKKI / ŞIKLARI İŞARETLEYİNİZ)

GÖZ	0	**NORMAL** [ ]
	1	**SADECE VİTREUS VE / VEYA ÖN KAMERADA HÜCRE** [ ]
	2	**% 50 GÖRME** [ ]
	3	**% 30 GÖRME** [ ]
	4	**BİRKAÇ METREDEN PARMAK SAYIYOR** [ ]
	5	**GÖRMÜYOR** [ ]
DERİ	1	**AFTLAR** [ ]
	1	**ERİTEMA NODOZUM** [ ]
	1	**GENİTAL ÜLSERLER** [ ]
DAMAR TUTULUMU		
	1	**TEK TARAFLI YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VEYA DVT** [ ]
	2	**ÇİFT TARAFLI YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VEYA DVT** [ ]
	3	**YÜZEYEL TROMBOFLEBİT VE DVT** [ ]
	4	**VCS VEYA VCİ TROMBOZU** [ ]
	5	**VCS VE VCİ TROMBOZU VE / VEYA ARTERİYEL OKLÜZYON** [ ]
ARTRİT		
	1	**HER BİR EKLEM** [ ]
NÖROLOJİK TUTULUM		
	2	**İNTRAKRANİYAL HİPERTANSİYON (BASINÇ ARTIŞI)** [ ]
	4	**MULTİPL SKLEROZ BENZERİ SENDROM** [ ]
	5	**PİRAMİDAL VE / VEYA SEREBELLAR TUTULUM** [ ]

TEŞEKKÜR EDERİZ

MB1 / OB1 / VB1 / K1 ← Lütfen Her 2 Tüpün Üzerine Yazınız

Lütfen Tüpleri Tam Doldurup Karıştırınız

EK 3 RNA VE ARNA ANALİZLERİ

KOD	GRUP	ÖRNEK İSMİ	HASTA RUMUZ	RNA [ ] (ng/uL)	RNA 260/280	AGILENT RIN	aRNA [ ] (ng/uL)	aRNA 260/280
32	B	B1	RK	96.2	2.27	8.1	592.4	1.94
33	B	B2	MFA	97.8	2.29	9.1	1065.05	2
51	B	B3	İB	73.3		7.6	1050.58	2.04
64	B	B4	HK	48	2.45	7.8	1010.34	2
82	B	B5	SM	203.4	2.21	6.8	842.28	2.09
83	B	B6	UA	87	2.26		1029	2.02
84	B	B7	ZÇ	137	2.25		835.8	2.1
101	C	C1	TBO	68.3	2.29	8.2	1012.84	1.98
111	C	C10	OÇ	78.1		8.3	851.05	1.97
112	C	C11	CBA	48.1		8.3	753.48	1.98
113	C	C12	İİ	142		7.5	911.7	2.08
114	C	C13	ŞSO	92.5		8.2	623.5	1.95
115	C	C14	AÇ	47.6		8.4	762.59	1.97
116	C	C15	İÜ	33.8		8.3	619.72	1.97
102	C	C2	OE	81.8	2.33	7.7	767.2	2.01
94	C	C3	MÇ	49	2.35	8.1	997.33	2
103	C	C4	AOS	95.6	2.29	7.4	890	1.99
104	C	C5	BS	83.9	2.3	7.8	822.3	2
105	C	C6	YK	89.6	2.27		765.5	1.99
106	C	C7	MG	122.9	2.25	7.7	688.9	2.07
107	C	C8	ÜG	118.6	2.25	8.2	761.45	2.11
108	C	C9	HÇ	108	2.22		941.18	2.08
21	M	M1	ZE	47.7	2.38	8	812.46	1.99
31	M	M2	MÇ	79.1	2.24	8.3	727.7	1.99
54	M	M3	HY	82.7		7.2	649.4	1.96
62	M	M4	AA	52.2	2.33	8.1	751.54	2.05
63	M	M5	AÇ	62.4	2.38	7.8	1117.82	2
71	M	M6	AU	56.1	2.23		846.41	2.05
72	M	M7	GT	73.1	2.21	6.7	632.65	2.06
73	M	M8	NK	76.3	2.22	5.2	773.61	2.07
22	O	O1	MS	84.7	2.26	8.6	775.6	2.03
43	O	O2	HA	160.5	2.19	8.7	800.68	2.06
45	O	O3	MB	30.7	2.35	8.1	996.39	1.98
46	O	O4	ND	73.2	2.21	8.6	1172.85	1.99
48	O	O5	RS	60	2.19	8.5	840.89	1.97
11	V	V1	CY	122.2	2.21	8.1	837.99	2.09
12	V	V2	İU	60	2.26	8.1	997.2	1.99
41	V	V3	MA	113	2.21	8.3	986.31	2.09
42	V	V4	MÇ	59.8	2.21		1111.3	2.03
47	V	V5	FY	56.1	2.33	8.3	1177.75	2
52	V	V6	HK	77.5		7.9	981.1	2.05
53	V	V7	MÖ	144.6		6.9	973.6	2.05
61	V	V8	AÖ	116.3	2.22	8	585.16	2.09
92	V	V9	TU	55.3	2.42	7.3	1036.68	2.01

EK 4 EXPERIMENT DESCRIPTOR FILE

EXP NAMES	CODE	BxC	MOVxC	MxC	OxC	VxC	MxO	MxV	OxV	MxOxV	GENDER	AGE Ex	M INV	O INV	V INV	MSS I	GIS I	CNS I
D1	32	B									M	32	M		V	MSS I		
D2	33	B									M	18	M				GIS I	
D3	51	B									M		M		V	MSS I		
D4	64	B									M	32	M	O	V			
D5	82	B									M	34	M	O	V			
D6	83	B									M	22	M		V			CNS I
D7	84	B									M	40	M	O	V	MSS I		
C1	101	C	C	C	C	C					M	19						
C10	111	C	C	C	C	C					M	57						
C11	112	C	C	C	C	C					F	24						
C12	113	C	C	C	C	C					F	27						
C13	114	C	C	C	C	C					F	42						
C14	115	C	C	C	C	C					F	45						
C15	116	C	C	C	C	C					F	57						
C2	102	C	C	C	C	C					M	21						
C3	94	C	C	C	C	C					M	27						
C4	103	C	C	C	C	C					M	33						
C5	104	C	C	C	C	C					M	34						
C6	105	C	C	C	C	C					M	36						
C7	106	C	C	C	C	C					M	37						
C8	107	C	C	C	C	C					M	42						
C9	108	C	C	C	C	C					M	48						
M1	21	B	B	M			M	M		M	F	56	M					
M2	31	B	B	M			M	M		M	F	57	M					
M3	54	B	B	M			M	M		M	F	42	M					
M4	62	B	B	M			M	M		M	F	29	M					
M5	63	B	B	M			M	M		M	F	46	M					
M6	71	B	B	M			M	M		M	F	25	M					
M7	72	B	B	M			M	M		M	F	27	M					
M8	73	B	B	M			M	M		M	M	53	M					
O1	22	B	B		O		O		O	O	M	24	M	O				
O2	43	B	B		O		O		O	O	F	58	M	O				
O3	45	B	B		O		O		O	O	F	26	M	O				
O4	46	B	B		O		O		O	O	F	47	M	O				
O5	48	B	B		O		O		O	O	M	18	M	O				
V1	11	B	B			V		V	V	V	M	35	M		V			
V2	12	B	B			V		V	V	V	M	43	M		V			
V3	41	B	B			V		V	V	V	M	28	M		V			
V4	42	B	B			V		V	V	V	M	33	M		V			
V5	47	B	B			V		V	V	V	M	27	M		V			
V6	52	B	B			V		V	V	V	M	56	M		V			
V7	53	B	B			V		V	V	V	M	28	M		V			
V8	61	B	B			V		V	V	V	M	32	M		V			
V9	92	B	B			V		V	V	V	M	36	M		V			

ÖZGEÇMİŞ

DOÇ. DR. ALİ KEMAL OĞUZ

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Ali Kemal Oğuz
2. **Doğum Tarihi:**
3. **Ünvanı:** Doçent Doktor (İç Hastalıkları)
4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıp Doktoru	Hacettepe	
Y. Lisans	-	-	-
Doktora 1	İç Hastalıkları	Hacettepe	
Doktora 2	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	Hacettepe	
Doktora 3	Temel Biyoteknoloji	Ankara	Tez aşa.

5. **Akademik Ünvanlar:**

   Yardımcı Doçentlik tarihi:

   Doçentlik tarihi:
6. **Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri:**

   6.1. Yüksek Lisans Tezleri:

   -

   6.2. Doktora Tezleri:

   i. Şahin Doğanay, (2011). Bilgisayarlı tomografi anjiyografi ile pulmoner emboli tanısı konulan hastalarda kontrast madde nefropatisi insidans ve risk faktörlerinin belirlenmesi. Tıpta Uzmanlık. Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

   ii. Gülay Köse, (2018). Tip 2 DM'li hastalarda total ve serbest vitamin D düzeyleri ile DM'nin mikrovasküler komplikasyonları ve CRP düzeyi arasındaki ilişki. Tıpta Uzmanlık. Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
7. **Yayınlar:**

   7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI)

   i. DOĞAN TURAÇLI İREM, ÇANDAR TUBA, YÜKSEL EMİNE BERRİN, KALAY ŞEBNEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEMİRTAŞ SELDA (2018). Potential effects of metformin in DNA BER system based on oxidative status in type 2 diabetes. Biochimie, 154: 62-68.

   ii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, TAŞIR YILMAZ SEDA, OYGÜR ÇAĞDAŞ ŞAHAP, ÇANDAR TUBA, SAYIN IRMAK, SERİN KILIÇOĞLU SİBEL, ERGÜN İHSAN, ATEŞ AŞKIN, ÖZDAĞ HİLAL, AKAR NEJAT (2016). Behçet's:

1

A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study. Plos One, 11(2), 149052.

iii. TAŞDEMİR VİLDAN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK, ERGÜN İHSAN (2015). Hyponatremia in the outpatient setting: clinical characteristics, risk factors, and outcome. International Urology and Nephrology, 47(12), 1977-1983.

iv. DOĞANAY ŞAHİN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2015). Increased risk of contrast-induced acute kidney injury in patients with pulmonary thromboembolism. Renal Failure, 37(7), 1138-1144.

v. **OĞUZ ALİ KEMAL**, TAŞIR YILMAZ SEDA, AKAR NEJAT, ÖZDAĞ HİLAL, GÜRLER AYSEL, ATEŞ AŞKIN, OYGÜR ÇAĞDAŞ ŞAHAP, SERİN KILIÇOĞLU SİBEL, DEMİRTAŞ SELDA (2015). C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis. Medical Hypotheses, 85(2), 186-191.

vi. ŞEKER RABİA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZDEMİR SEDAT, DEMİRTAŞ SELDA, AYLI MELTEM, MERGEN KONÇUY (2014). Kan kaybına bağlı hemoglobin düşüklüğü ve hipoksemi durumunda kardiak iskemi belirteci olarak IMA. Turkish Journal of Biochemistry-Türk Biyokimya Dergisi, 39(2), 221-225.

vii. BALCI SEVİM, YÜKSEL EMİNE BERRİN, ATİK FATİH, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN MEHMET ALİ, BALTACI VOLKAN, KOSYAKOVA NADEZDA, LIEHR THOMAS (2010). Partial deletion of the long arm of chromosome 13 (q32q33.2) associated with mental retardation, choanal atresia and fish mouth. Genetic Counseling, 21(3), 317-324.

viii. KAYA CEMİL, PABUÇCU RECAİ, KOCA CEMİLE, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERKAN AYCAN FAHRİ, KORKMAZ AYHAN, ERBAŞ DENİZ (2010). Relationship between interleukin-6 levels and ambulatory blood pressure in women with polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility, 94(4), 1437-1443.

ix. LEVENTOĞLU ALEV, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÜNAL MEHMET ZÜLKÜF (2009). Clinical Utility of Facial and Dorsal Sural Nerve Conduction Studies in Patients With Early Stage Type II Diabetes Mellitus. Journal of Neurological Sciences, 26(1), 1-7.

x. **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZÇAKAR LEVENT, KAYMAK BAYRAM (2006). Rare abdominal findings in Behçet's disease. Clinical Rheumatology, 25(6), 889-890.

xi. **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZÇAKAR LEVENT, KAYMAK BAYRAM (2005). Severe necrotic scrotal ulcers: A relapse note in Behçet's disease. Rheumatology, 44(3), 401.

xii. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2005). Do we speak the same language for ITP? Platelets, 16(1), 63.

xiii. KAYMAK BAYRAM, ÖZÇAKAR LEVENT, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ARSAVA ETHEM MURAT, ÖZDÖL ÇAĞDAŞ (2004). A novel finding in thoracic outlet syndrome: Tachycardia. Joint Bone Spine, 71(5), 430-432.

xiv. ÖZÇAKAR LEVENT, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2003). Spinach attack: A funny turn in gouty arthritis. Rheumatology International, 23(6), 327.

7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

i. SAYIN IRMAK, AYLI MELTEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, GÜLDANE CENGİZ SEVAL (2016). Xanthelasma palpebrarum: a new side effect of nilotinib. BMJ Case Reports, 2015213511.

ii. BEYLER KILIÇ ÖZLEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN, BAYDAR DİLEK, AYLI MELTEM (2015). Nonsecretory Multiple Myeloma and AL Amyloidosis Presenting with Nephrotic Range Proteinuria. Case Reports in Nephrology, 2015, 1-4.

iii. AKDOĞAN LEYLA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN TARKAN, ERGÜN İHSAN (2015). The Rarest of the Rare: Crossed Fused Renal Ectopia of the Superior Ectopia Type. Case Reports in Nephrology, 2015, 1-4.

7.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

i. DOĞAN TURAÇLI İREM, ÇANDAR TUBA, YÜKSEL EMİNE BERRİN, KALAY ŞEBNEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEMİRTAŞ SELDA (2017). Potential effects of metformin in DNA BER system based on oxidative status in type 2 diabetes. 6th International Congress of Molecular Medicine.

ii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, YILMAZ SEDA, ÖZDAĞ HİLAL, AKAR NEJAT (2016). Behçet's syndrome: The critical balance between the pro-inflammatory and the anti-inflammatory genes. 41st FEBS Congress.

iii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, YILMAZ SEDA, ÖZDAĞ HİLAL, AKAR NEJAT (2016). Whole-genome expression analysis in Turkish patients with Behçet's syndrome. 41st FEBS Congress.

iv. BEYLER KILIÇ ÖZLEM, ERGÜN İHSAN, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, KALAY ŞEBNEM, AYLI MELTEM (2015). Nonsecretory multiple myeloma and AL amyloidosis. 5th International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma.

v. EKİCİ BERKAY, SAYIN IRMAK, ERKAN AYCAN FAHRİ, AKGÜL ERCAN EBRU, ALHAN ASLIHAN, AYLI MELTEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, TÖRE HASAN FEHMİ, ÇEHRELİ SENGÜL (2009). The correlation between mean platelet volume and the Gensini Score. 5th Annual Congress on Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery.

vi. EKİCİ BERKAY, SAYIN IRMAK, AKGÜL ERCAN EBRU, ERKAN AYCAN FAHRİ, AYLI MELTEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ALHAN ASLIHAN, ÇEHRELİ SENGÜL, TÖRE HASAN FEHMİ (2009). The relationship between increased mean platelet volume and serum uric acid levels. 5th Annual Congress on Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery.

vii. SAYIN IRMAK, EKİCİ BERKAY, EVRİN TOGAY, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÇEHRELİ SENGÜL (2009). Hypotension and bradycardia secondary to honey intoxication. 5th Annual Congress on Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery.

viii. KARADAĞ DEMET, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZDÖL NALAN ÇİÇEK, AKINCI TUĞBA (2009). Dialysis-related cervical spondyloarthropathy: MRI findings. Spine Radiology, Diagnostic and Interventional, 1st Joint Meeting of American Society of Spine Radiology and European Society of Neuroradiology.

ix. TUNCER YILMAZ HİLAL, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, AYLI MELTEM, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2009). The occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with chronic hepatitis B virus infection during treatment with pegylated interferon alpha-2a. 8th Congress of European Federation of Internal Medicine.

x. SAYIN IRMAK, TUNCER YILMAZ HİLAL, DOĞANAY ŞAHİN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEĞERTEKİN MUSTAFA BÜLENT (2009). An important manifestation of inflammatory bowel disease-venous thromboembolism: Report of two cases. 8th Congress of European Federation of Internal Medicine.

xi. SAYIN IRMAK, KARAMAN MEHMET ALPER, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAN AYLA (2009). Nephrotic syndrome as the first manifestation of familial mediterranean fever. 8th Congress of European Federation of Internal Medicine.

xii. AYLI MELTEM, SAYIN IRMAK, TUNCER YILMAZ HİLAL, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2009). Primary non-hodgkin lymphoma of spine: A case report. 2nd International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma.

xiii. AYLI MELTEM, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, TUNCER YILMAZ HİLAL (2009). Pulmonary embolism as the first sign of primary peritoneal lymphomatosis: A case report. 2nd International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma.

xiv. AYLI MELTEM, TUNCER YILMAZ HİLAL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK (2009). Malign pleural effusion with multiple myeloma. 2nd International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma.

xv. KILINÇ SERPİL, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, AYLI MELTEM (2006). Cocaine induced platelet function defects: A case report. 1st Balkan Hematology Days.

xvi. AYLI MELTEM, KILINÇ SERPİL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK (2006). A 77 year old patient with myelodysplastic syndrome / myeloproliferative disease unclassifiable and trisomy 8. 1st Balkan Hematology Days.

xvii. KAYMAK BAYRAM, ÖZÇAKAR LEVENT, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZDÖL ÇAĞDAŞ, ARSAVA ETHEM MURAT (2002). Thoracic outlet syndrome and tachycardia. 13th European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine.

xviii. PEKSOY İRFAN, ERCAN MERAL TAYAN, ARICA YEĞİN BETÜL, KAŞ H SÜHEYLA, TUNCEL MÜRVET, ŞENER BURÇİN, ASANSÜ AYŞE, ÜNSAL IŞIL S, **OĞUZ ALİ KEMAL** (1999). Phagocytic labelling of leukocytes with Tc-99m-PLA (Poly L-Lactic Acid) particles for imaging inflammation. 7th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation.

xix. CERRAHOĞLU AYŞE BEYHAN LALE, DİNÇER FİTNAT, ÜNLÜ ZELİHA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DURUÖZ MEHMET TUNCAY (1999). Validation of the Duruöz's Hand Index for osteoarthritis of the hand. 63rd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology.

xx. GÖKÇE KUTSAL YEŞİM, **OĞUZ ALİ KEMAL** (1998). Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on urinary pyridinoline cross-links values in women with postmenopausal osteoporosis. 2nd Mediterranean Congress of Physical Medicine and Rehabilitation.

7.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

-

7.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

i. APAYDIN ZİYA, KILIÇ ALPARSLAN, EKİCİ BERKAY, FAHRİ ERKAN AYCAN, ÖZDEMİR SEDAT, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2020). Predictive value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and serum ischemia-modified albumin for early diagnosis in patients with contrast-induced acute kidney injury. Med Bull Haseki, 58, 234-239.

ii. HAJİYEV CANAN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZEN MEHMET, DÜZGÜN NURŞEN (2017). Nadirlerin Birlikteliği: Nekrotizan Sarkoid Granülomatoz Seyrinde Kronik Miyelomonositer Lösemi Gelişimi. Lösemi Lenfoma Miyelom, 1(1), 22-25.

iii. COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2016). Prehipertansiyon. Kardiyoloji Forumu, 7(1), 1-6.

iv. AKDOĞAN LEYLA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2016). Birinci Basamakta Kronik Böbrek Hastalığına Yaklaşım. İç Hastalıkları Forumu, 4(1), 34-41.

v. **OĞUZ ALi KEMAL** (2015). Uçuş Hekimliği ve Hipertansiyon. Türk Kardiyoloji Seminerleri, 15(3), 163-171.

vi. **OĞUZ ALİ KEMAL**, KAYMAK BAYRAM (2011). Mesleki kas iskelet sistemi bozuklukları. Hacettepe Tıp Dergisi, 42(4), 165-172.

vii. KAYMAK BAYRAM, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2011). Mesleki kas iskelet sistemi bozuklukları: Temel bilim - Kas, iskelet ve sinir sistemi. Hacettepe Tıp Dergisi, 42(4), 160-164.

viii. DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2010). Akut ve kronik HBV infeksiyonunda doğal seyir. Güncel Gastroenteroloji, 14(2), 54-58.

ix. SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2008). Fonksiyonel dispepsinin değerlendirilmesinde klinik yaklaşım. Akademik Gastroenteroloji, 7(2), 91-95.

x. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2007). Sjögren sendromu: Nadir bir klinik seyir. Romatoloji ve Tıbbi Rehabilitasyon Dergisi, 18(3), 116-119.

xi. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2006). Aortite bağlı plevral efüzyon. Romatoloji ve Tıbbi Rehabilitasyon Dergisi, 17(4), 299-300.

xii. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2006). Düşük doz asetilsalisilik asit tedavisi ile tetiklenen adölesan gut olgusu. Romatoloji ve Tıbbi Rehabilitasyon Dergisi, 17(4), 272-276.

xiii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, GÖKÇE KUTSAL YEŞİM (2000). Postmenopozal osteoporozda intermitan siklik etidronat tedavisinin idrar pridinolin çapraz bağlarına etkisi. Osteoporoz Dünyasından (Türk Osteoporoz Dergisi), 6(2), 54-57.

xiv. **OĞUZ ALİ KEMAL**, GÖKÇE KUTSAL YEŞİM (1998). HIV İnfeksiyonu ve kas-iskelet sistemi sorunları. Türk HIV/AIDS Dergisi, 1(4), 141-148.

xv. BÜYÜKAŞIK YAHYA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, MÜMİN TÜRKER, ÖZCEBE OSMAN İLHAMİ (1995). Kanserde hemostaz bozuklukları: Tanı, patofizyoloji ve tedavi. Türk Hematoloji – Onkoloji Dergisi (International Journal of Hematology and Oncology), 5(3), 166-182.

xvi. **OĞUZ ALİ KEMAL** (1990). Romatoid artrit immünopatogenezi. Romatoloji ve Tıbbi Rehabilitasyon Dergisi, 1(1), 32-37.

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

i. **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖZEN MEHMET, DÜZGÜN NURŞEN (2016). Nadirlerin birlikteliği: Nekrotizan sarkoid granülomatoz seyrinde gelişen kronik miyelomonositik lösemi. 23. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi.

ii. COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2016). Renal transplant alıcılarında anjiotensin reseptör blokörlerinin kullanımının etkinliği ve güvenilirliği. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

iii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, YILDIRIM FUNDA, ERGÜN İHSAN, DÜZGÜN NURŞEN (2016). Bir olgu nedeniyle inflamatuvar abdominal aort anevrizması: Nadir ama unutulmamalı! 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

iv. YILDIRIM FUNDA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2016). Oral fosfat nefropatisi. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

v. ERGÜN İHSAN, ÇALIŞKAN KARTAL AYSUN, COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR, YILDIRIM FUNDA, EKMEKÇİ PERİHAN, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2016). Preoperatif "dipstick" proteinüri protez operasyonuna giden hastalarda akut böbrek hasarının belirleyicisi olabilir. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

vi. YILDIRIM FUNDA, COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ERGÜN İHSAN (2016). Programlı hemodiyaliz hastasında alveoler hemoraji. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

vii. ERGÜN İHSAN, YILDIRIM FUNDA, MORKAVUK GÜLİN, COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN REFAH (2016). Renal transplant alıcısında gözlenen bilateral düşük ayak. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

viii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, YILDIRIM FUNDA, ERGÜN İHSAN (2016). Behçet sendromu immünopatogenezinde antiinflamatuvar genlerin önemi; bir güncel durum değerlendirmesi. 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

ix. **OĞUZ ALİ KEMAL**, TAŞIR YILMAZ SEDA, ÖZDAĞ HİLAL, AKAR NEJAT (2015). CLEC12A: Behçet sendromu gelişiminde olası bir yeni yatkınlık geni. Türk Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi.

x. **OĞUZ ALİ KEMAL**, TAŞIR YILMAZ SEDA, ÖZDAĞ HİLAL, AKAR NEJAT (2015). Behçet: Hastalık mı sendrom mu? Bir genom-boyu ifade analizinin olası cevabı. Türk Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi.

xi. KAYA ESAT KIVANÇ, ERGÜN İHSAN, ÇANDAR TUBA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEMİRTAŞ SELDA (2015). Komplikasyonsuz tip 2 diabetes mellituslu hastalarda serum ürik asit düzeyi oksidatif stresin göstergesi değildir. Türk Nefroloji Derneği 32. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi.

xii. ÖZDEMİR SEDAT, ÇANDAR TUBA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEMİRTAŞ SELDA, AYLI MELTEM (2015). Türk toplumunda vitamin B12 ve ilişkili belirteçlerin genç orta yaş sağlıklı bireylerde referans aralıklarının belirlenmesi. Türk Hematoloji Derneği 41. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xiii. AYLI MELTEM, KALAY ŞEBNEM, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR (2015). Dasatinibe bağlı şilotoraks

gelişen bir kronik miyelositer lösemi olgusu. Türk Hematoloji Derneği 41. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xiv. AYLI MELTEM, SAYIN IRMAK, UMUDUM HALDUN, AKINCIOĞLU EGEMEN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, KALAY ŞEBNEM, COŞARDERELİOĞLU ÇAĞLAR (2015). Midede lokalize CD5+ T-hücreden zengin B hücreli lenfoma. Türk Hematoloji Derneği 41. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xv. ÖZDEMIR SEDAT, ÇANDAR TUBA, ÇAĞLAR GAMZE SİNEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, TAŞÇI YASEMİN, DEMİRTAŞ SELDA, URAL KAYALIK HESNA, MERGEN KONÇUY (2014). Anormal fetal kalp hızı paterninde doğum şekline göre maternal ve fetal iskemi modifiye albumin (IMA) seviyeleri. Türk Klinik Biyokimya Derneği 14. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi.

xvi. AYLI MELTEM, TUNCER YILMAZ HİLAL, DEĞERTEKİN MUSTAFA BÜLENT, DEĞERTEKIN HALİL BİNGÖL, ÇOBAN MEHMET, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2010). Ozon tedavisine bağlı immün hemolitik anemi. Türk Hematoloji Derneği 36. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xvii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, GÜNEŞ GÜRSEL (2009). Onkolojide yeni moleküler tedavi ajanları: Küçük interferans yapan RNA'lar ("siRNAs"). Biyoteknoloji Derneği 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi.

xviii. GÜNEŞ GÜRSEL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2009). Abdominal tüberküloz lenfadenit: Olgu sunumu. Türk Gastroenteroloji Derneği 26. Ulusal Gastroenteroloji Haftası.

xix. GÜNEŞ GÜRSEL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2009). Metastatik meme kanserine ikincil portal hipertansiyon ve özefagus varis kanaması. Türk Gastroenteroloji Derneği 26. Ulusal Gastroenteroloji Haftası.

xx. AYLI MELTEM, TUNCER YILMAZ HİLAL, SAYIN IRMAK, EKİCİ BERKAY, GÜNEŞ GÜRSEL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DOĞAN HANDAN (2009). Miyelomatöz plevral efüzyonun Bortezomib ile tedavisi. Türk Hematoloji Derneği 35. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xxi. AYLI MELTEM, SAYIN IRMAK, TUNCER YILMAZ HİLAL, GÜNEŞ GÜRSEL, EKİCİ BERKAY, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2009). Rituksimab monoterapisi ile remisyon sağlanan soğuk agglütinin hastalığı. Türk Hematoloji Derneği 35. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xxii. AYLI MELTEM, EKİCİ BERKAY, **OĞUZ ALİ KEMAL**, TUNCER YILMAZ HİLAL, SAYIN IRMAK, GÜNEŞ GÜRSEL, DOĞAN HANDAN (2009). Kemik iliği tutulumu ile başvuran bir liposarkom olgusu. Türk Hematoloji Derneği 35. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xxiii. GÜNEŞ GÜRSEL, DEĞERTEKİN MUSTAFA BÜLENT, **OĞUZ ALİ KEMAL**, EKİCİ BERKAY, SAYIN IRMAK, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2009). Behçet Hastalığı'nda gastrointestinal ve kardiyak tutulum; nadir görülen bir ikili. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxiv. GÜNEŞ GÜRSEL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, EKİCİ BERKAY, TAŞDEMİR VİLDAN, SAYIN IRMAK, AYLI MELTEM (2009). Kemik iliği metastazı ile gelen bir prostat kanseri olgusu. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxv. TUNCER YILMAZ HİLAL, **OĞUZ ALİ KEMAL**, AYLI MELTEM (2009). İdiyopatik trombositopenide H. pylori eradikasyonu. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxvi. **OĞUZ ALİ KEMAL**, TUNCER YILMAZ HİLAL, KARAMAN MEHMET ALPER, SAYIN IRMAK (2009). "Omik"ler dönemi: İç Hastalıkları uzmanı neler bilmeli. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxvii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, KARAMAN MEHMET ALPER, TUNCER YILMAZ HİLAL, SAYIN IRMAK (2009). Küçük interferans yapan RNA'lar: Yeni moleküler tedavi ajanları. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxviii. TUNCER YILMAZ HİLAL, ERGÜN İHSAN, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2009). Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF): Yalnız çocuk ve genç hastalığı değil. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxix. TUNCER YILMAZ HİLAL, DEĞERTEKİN MUSTAFA BÜLENT, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÇOBAN MEHMET, MORKAVUK GÜLİN (2009). Çölyak hastalığının nadir bir prezentasyon şekli: Huzursuz Bacak Sendromu. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxx. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2008). RNA İnterferansı: Romatizmal hastalıkların tedavisinde yeni bir seçenek. Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği 3. Ulusal Romatizmal Hastalıklar Kongresi.

xxxi. LEVENTOĞLU ALEV, İNCE FERDA, **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÖNAL MEHMET ZÜLKÜF (2008). Erken dönem Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda fasial ve dorsal sural sinir iletim çalışmalarının klinik değeri. Türk Nöroloji Derneği 44. Ulusal Nöroloji Kongresi.

xxxii. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2008). Osteoporoz araştırmalarında deneysel metotlar. Türkiye Osteoporoz Derneği 3. Ulusal Osteoporoz Kongresi.

xxxiii. TUNCER YILMAZ HİLAL, SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAN AYLA, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2008). Lenfadenopati ile prezente olan amiloid vakası. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxxiv. SAYIN IRMAK, **OĞUZ ALİ KEMAL**, DEĞERTEKİN HALİL BİNGÖL (2008). Radyolojik olarak fokal nodüler hiperplaziyi taklit eden nöroendokrin tümör: Olgu sunumu. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.

xxxv. AYLI MELTEM, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2008). Kronik böbrek yetmezliğinin eşlik ettiği İmatinib'e dirençli bir KML olgusunda Dasatinib kullanımı. Türk Hematoloji Derneği 34. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xxxvi. ÜNAL TANNUR, **OĞUZ ALİ KEMAL**, MERGEN KONÇUY, KARACA LEVENT, DEMİRTAŞ SELDA (2008). Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rıdvan Ege Hastanesi'ne başvuran sağlıklı donör kanlarında çinko referans çalışması. Türk Klinik Biyokimya Derneği 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi.

xxxvii. **OĞUZ ALİ KEMAL** (2007). Yapay ekstrakorporal karaciğer destek tedavisinin dünü, bugünü ve yarını. Biyoteknoloji Derneği 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi.

xxxviii. AYLI MELTEM, GEÇİM İBRAHİM ETHEM, AYDIN MUHAMMED SİNAN, **OĞUZ ALİ KEMAL** (2007). İmatinib mesilat ile tedavi

esnasında gelişen ciddi immün hemolitik anemi. Türk Hematoloji Derneği 33. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xxxix. AYLI MELTEM, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK (2007). İmatinib tedavisine bağlı batında yaygın asit. Türk Hematoloji Derneği 33. Ulusal Hematoloji Kongresi.

xl. AKPEK GÖRGÜN, KOÇ YENER, KANSU EMİN, KARS SAİME AYŞE, GÜLER NİLÜFER, TEKUZMAN GÜLTEN, BALTALI EŞMEN, **OĞUZ ALİ KEMAL**, CANPINAR HANDE, FIRAT DİNÇER (1993). Yeni tanı almış akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastalarda mitoxantrone, vincristine, prednisone kemoterapisi sonuçları. Türk Hematoloji Derneği 23. Ulusal Hematoloji Kongresi.

7.7. Diğer yayınlar

i. COVID-19 PANDEMİSİNDEN ÖĞRENDİKLERİMİZ, GELECEK ÖNGÖRÜLERİ VE YARININ PLANLANMASI, Bölüm adı: KRONİK HASTALIKLARDA COVİD-19 (2020). **OĞUZ ALİ KEMAL**, FİDAN CİHAN, TÜSAD EĞİTİM KİTAPLARI SERİSİ, Editörler: GÜNTÜLÜ AK, ÜLKÜ YILMAZ, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 305, ISBN: 978-605-89519-7-6, Türkçe (Bilimsel Kitap).

ii. ORTOPEDİK NÖROLOJİ, Bölüm adı: SERVİKAL KORD LEZYONLARI: TETRAPLEJİ (2018). **OĞUZ ALİ KEMAL**, HİPOKRAT YAYINEVİ, Editör: GÜL BALTACI, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 110, ISBN: 978-605-9160-90-2, Türkçe (Kitap Tercümesi).

iii. TEMEL ROMATİZMAL HASTALIKLAR, Bölüm adı: İNFEKSİYÖZ HASTALIKLAR (2014). **OĞUZ ALİ KEMAL**, PELİKAN KİTABEVİ, Editör: FUNDA TAŞÇIOĞLU, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 721, ISBN: 978-605-64741-2-5, Türkçe (Kitap Tercümesi).

iv. TEMEL ROMATİZMAL HASTALIKLAR, Bölüm adı: KEMİK VE EKLEM DİSPLAZİLERİ (2014). **OĞUZ ALİ KEMAL**, PELİKAN KİTABEVİ, Editör: FUNDA TAŞÇIOĞLU, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 721, ISBN: 978-605-64741-2-5, Türkçe (Kitap Tercümesi).

v. TEMEL ROMATİZMAL HASTALIKLAR, Bölüm adı: ARTRİTİN CERRAHİ TEDAVİSİ (2014). **OĞUZ ALİ KEMAL**, VURAL ALP CELAL, PELİKAN KİTABEVİ, Editör: FUNDA TAŞÇIOĞLU, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 721, ISBN: 978-605-64741-2-5, Türkçe (Kitap Tercümesi).

vi. İÇ HASTALIKLARI ATLASI, Bölüm adı: ROMATOLOJİ (2013). **OĞUZ ALİ KEMAL**, KARAMAN MEHMET ALPER, MALKAN ÜMİT YAVUZ, PALME KİTABEVİ, Editörler: GÜRBÜZ ERDOĞAN, ALİ KEMAL OĞUZ, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 616, ISBN: 978-605-355-108-9, Türkçe (Kitap Tercümesi).

vii. İÇ HASTALIKLARI ATLASI, Bölüm adı: ONKOLOJİ (2013). BERK ARİF ÖNDER, **OĞUZ ALİ KEMAL**, SAYIN IRMAK, KARAMAN MEHMET ALPER, PALME KİTABEVİ, Editörler: GÜRBÜZ ERDOĞAN, ALİ KEMAL OĞUZ, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 616, ISBN: 978-605-355-108-9, Türkçe (Kitap Tercümesi).

viii. İÇ HASTALIKLARI ATLASI, (2013). PALME KİTABEVİ, Editörler: GÜRBÜZ ERDOĞAN, **ALİ KEMAL OĞUZ**, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 616, ISBN: 978-605-355-108-9, Türkçe (Kitap Tercümesi).

ix. ROMATİZMAL HASTALIKLAR EL KİTABI, Bölüm adı: HİKAYE VE FİZİK MUAYENE (2012). **OĞUZ ALİ KEMAL**, PELİKAN KİTABEVİ,

Editör: ALİ KEMAL OĞUZ, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 242, ISBN: 978-605-63058-1-8, Türkçe (Kitap Tercümesi).

x. ROMATİZMAL HASTALIKLAR EL KİTABI (2012). PELİKAN KİTABEVİ, Editör: **ALİ KEMAL OĞUZ**, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 242, ISBN: 978-605-63058-1-8, Türkçe (Kitap Tercümesi).

xi. YOĞUN BAKIMDA BESLENME, Bölüm adı: İNMEDE BESLENME DESTEĞİ (2009). **OĞUZ ALİ KEMAL**, ÜNAL ÇEVİK IŞIN, ÜNAL MEHMET ZÜLKÜF, PALME KİTABEVİ, Editörler: HAKAN SABUNCUOĞLU, CENAP DENER, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 204, Türkçe (Bilimsel Kitap).

xii. YOĞUN BAKIMDA BESLENME, Bölüm adı: GERİYATRİK HASTADA BESLENME DESTEĞİ (2009). **OĞUZ ALİ KEMAL**, PALME KİTABEVİ, Editörler: HAKAN SABUNCUOĞLU, CENAP DENER, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 204, Türkçe (Bilimsel Kitap).

xiii. **OĞUZ ALİ KEMAL**, H İndeksi. Türk Nöroşirurji Derneği Akademik Yazım Eğitimi Toplantısı.

xiv. **OĞUZ ALİ KEMAL**, Sağlık bilimlerinde tez hazırlama ilkeleri. Türk Nöroşirurji Derneği Akademik Yazım Eğitimi Toplantısı.

xv. **OĞUZ ALİ KEMAL**, Anemilerde ayırıcı tanı ve tedavi. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği Genç Dahiliyeciler Kış Okulu.

7.8. Uluslararası atıflar

Sayfa 12'de yer almaktadır.

8. Ulusal ve Uluslararası Projeler

i. "Behçet Sendromu'nda miRNom ve Transkriptom Profillerinin Entegrasyonu", TÜBİTAK, Proje No: 116S501, Yürütücü, Devam ediyor.

ii. "Bir Antidiyabetik ve Potansiyel Antikanser Ajan Olan Metformin'in Tip 2 Diyabet Hastaları ve Oksidatif Stres İndüklenmiş Kanser Hücre Hatlarında DNA Baz Kesip Çıkarma Onarımına Etkisi", TÜBİTAK, Proje No: 115S015, Araştırmacı, Tamamlanmış.

iii. "Vitamin B12 İlişkili Belirteçlerin Genç-Orta Yaş Sağlıklı Donörlerde Referans Aralıklarının Belirlenmesi", TÜBİTAK, Proje No: 114S844, Araştırmacı, Tamamlanmış.

9. İdari Görevler

i. Fakülte Yönetim Kurulu Üyeliği, UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2006-2018.

ii. Eğitim Koordinatörü (Dönem III), UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2007-2018.

iii. Transfüzyon Komitesi Üyeliği, UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2009-2018.

iv. Dönem III TIP301 Klinik Bilimlere Giriş Dersi Sorumlu Öğretim Üyesi, UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2009-2011.

v. Bologna Koordinatörü, UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2009-2011.

vi. Yoğun Bakım Ünitesi Sorumlu Hekimi, UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2009-2011.

vii. Genel Dahiliye Bilim Dalı Başkanı, BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2018- .
viii. Yardımcı Eğitim Koordinatörü (Dönem III), BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2018-2020.
ix. Eğitim Koordinatörü (Dönem III, İngilizce Program), BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, 2020- .

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

i. Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği, Üye , 2016- .
ii. Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği, Üye , 2016- .
iii. Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Uzman Hekimleri Derneği, Üye , 2016- .
iv. American College of Physicians, Member, 2018- .
v. Royal College of Physicians (London), Associate Member, 2019- .

11. Ödüller

i. "Prof. Dr. Şeref Zileli" Yılın Başarılı Asistanı Özel Ödülü, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI, 1994.

12. Son iki yılda verilen lisans ve lisansüstü düzeydeki dersler

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Ders Saati		Öğrenci Sayısı
			Teo.	Uyg.	
2019-20	Güz	İç Hastalıkları'nda Öykü ve FM	4	19	97
		Periferik Yayma	1	2	
		Ateroskleroz ve Koruyucu Hekimlik	1	-	
		Ödem Fizyopatolojisi	1	-	
		Splenomegali	1	-	
		İştah, Vücut Ağırlığı Düzenlenmesi	1	-	
		Kabızlık	1	3	
	Bahar	İç Hastalıkları'nda Öykü ve FM	4	19	97
		Periferik Yayma	1	2	
		Ateroskleroz ve Koruyucu Hekimlik	1	-	
		Ödem Fizyopatolojisi	1	-	
		Splenomegali	1	-	
		İştah, Vücut Ağırlığı Düzenlenmesi	1	-	
		Kabızlık	1	3	
2020-21	Güz	İç Hastalıkları'nda Öykü ve FM	4	19	99
		Periferik Yayma	1	2	
		Ateroskleroz ve Koruyucu Hekimlik	1	-	
		Ödem Fizyopatolojisi	1	-	
		Splenomegali	1	-	
		İştah, Vücut Ağırlığı Düzenlenmesi	1	-	
		Kabızlık	1	3	
	Bahar	İç Hastalıkları'nda Öykü ve FM	4	19	99
		Periferik Yayma	1	2	
		Ateroskleroz ve Koruyucu Hekimlik	1	-	
		Ödem Fizyopatolojisi	1	-	
		Splenomegali	1	-	
		İştah, Vücut Ağırlığı Düzenlenmesi	1	-	
		Kabızlık	1	3	

Uluslararası atıflar

Makale Başlığı	Dergi	Yayın Yılı	Toplam Atıf
A novel finding in thoracic outlet syndrome: tachycardia	JOINT BONE SPINE	2004	22
Potential effects of metformin in DNA BER system based on oxidative status in type 2 diabetes	BIOCHIMIE	2018	11
Relationship between interleukin-6 levels and ambulatory blood pressure in women with polycystic ovary syndrome	FERTILITY AND STERILITY	2010	9
Behcet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study	PLOS ONE	2016	8
Hyponatremia in the outpatient setting: clinical characteristics, risk factors, and outcome	INTERNATIONAL UROLOGY AND NEPHROLOGY	2015	5
C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behcet's syndrome and acute gouty arthritis	MEDICAL HYPOTHESES	2015	4
Partial Deletion of the Long Arm of Chromosome 13 (q32q33.2) Associated with Mental Retardation, Choanal Atresia and Fish Mouth	GENETIC COUNSELING	2010	4
Increased risk of contrast-induced acute kidney injury in patients with pulmonary thromboembolism	RENAL FAILURE	2015	3
Validation of the Duruoz's Hand Index (DHI) for osteoarthritis (OA) of the hand.	ARTHRITIS AND RHEUMATISM	1999	3
The evaluation of IMA as a cardiac ischemia marker in the cases of hypohemoglobinemia and hypoxemia due to blood loss	TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY	2014	2
Rare abdominal findings in Behcet's disease	CLINICAL RHEUMATOLOGY	2006	2
Clinical Utility of Facial and Dorsal Sural Nerve Conduction Studies in Patients With Early Stage Type II Diabetes Mellitus	JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES-TURKISH	2009	1
Spinach attack: a funny turn in gouty arthritis	RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL	2003	1
Predictive Value of Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin and Serum Ischemia-modified Albumin for Early Diagnosis in Patients with Contrastinduced Acute Kidney Injury	MEDICAL BULLETIN OF HASEKI	2020	0
Behcet's syndrome: the critical balance between the pro-inflammatory and the anti-inflammatory genes	FEBS JOURNAL	2016	0
Whole-genome expression analysis in Turkish patients with Behcet's syndrome	FEBS JOURNAL	2016	0
Severe necrotic scrotal ulcers: a relapse note in Behcet's disease	RHEUMATOLOGY	2005	0
Do we speak the same language for ITP?	PLATELETS	2005	0

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Medical Hypotheses 85 (2015) 186–191

Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy

C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis

Ali Kemal Oğuz *, Seda Yılmaz, Nejat Akar, Hilal Özdağ, Aysel Gürler, Aşkın Ateş, Çağdaş Şahap Oygür, Sibel Serin Kılıçoğlu, Selda Demirtaş

Department of Internal Medicine, Ufuk University School of Medicine, Ankara, Turkey
Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 January 2015
Accepted 25 April 2015

ABSTRACT

C-type lectin domain family 12, member A (CLEC12A) is a C-type lectin-like pattern recognition receptor capable of recognizing monosodium urate crystals. Monosodium urate crystals, the causative agents of gout are also among the danger-associated molecular patterns reflecting cellular injury/cell death. In response to monosodium urate crystals, CLEC12A effectively inhibits granulocyte and monocyte/macrophage functions and hence acts as a negative regulator of inflammation. Behçet's syndrome and gout are autoinflammatory disorders sharing certain pathological (neutrophilic inflammation), clinical (exaggerated response to monosodium urate crystals) and therapeutic (colchicine) features. We propose the hypothesis that decreased expression of CLEC12A is a common denominator in the hyperinflammatory responses observed in Behçet's syndrome and gout. Major lines of evidence supporting this hypothesis are: (1) Downregulation/deficiency of CLEC12A is associated with hyperinflammatory responses. (2) *CLEC12A* polymorphisms with functional and clinical implications have been documented in other inflammatory diseases. (3) Colchicine, a fundamental therapeutic agent used both in Behçet's syndrome and gout is shown to oppose the downregulation of CLEC12A. (4) Behçet's syndrome and gout are characterized by a hyperinflammatory response to monosodium urate crystals and other than gout, Behçet's syndrome is the only inflammatory condition exhibiting this exaggerated response. (5) Genomewide linkage and association studies of Behçet's syndrome collectively point to 12p12–13, the chromosomal region harboring *CLEC12A*. (6) Patients with severe forms of Behçet's syndrome underexpress CLEC12A with respect to patients with mild forms of the disease. If supported by well-designed, rigorous experiments, the forementioned hypothesis pertinent to CLEC12A will carry important implications for therapy, designing experimental models, and uncovering immunopathogenic mechanisms in Behçet's syndrome and gout.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Background

C-type lectin domain family 12, member A (CLEC12A) and monosodium urate crystals

Lectins are a diverse group of proteins exhibiting high specificity and binding properties for carbohydrate moieties. C-type lectins (CLECs) as their name implies, are calcium dependent lectins which require calcium while binding to their specific carbohydrate moieties [1]. Concisely, CLECs are believed to be the most prevalent lectins in immunity. While mediating immune responses, CLECs mainly act as adhesion molecules or signaling receptors [2].

C-type lectin domain family 12, member A (CLEC12A, also known as MICL and CLL1) is a glycoprotein encoded by the gene *CLEC12A* located at 12p13.2 [3]. Initially, CLEC12A was identified as an inhibitory C-type lectin-like receptor whose expression was primarily restricted to granulocytes and monocytes and hence given the name myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) [4]. Detailed characterization of CLEC12A demonstrated that it is a transmembrane protein containing a cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) [4]. As expected, chimeric analyses showed that CLEC12A can inhibit cellular activation through its cytoplasmic ITIM and is a negative regulator of granulocyte and monocyte function [4]. Further studies documented that CLEC12A is also expressed on dendritic cells and is down-regulated following cellular activation [5].

* Corresponding author at: Department of Internal Medicine, Ufuk University School of Medicine, Dr. Rıdvan Ege Hastanesi, Konya Yolu No: 86-88, 06520 Balgat, Ankara, Turkey. Tel.: +[redacted]
E-mail address: [redacted]

http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.04.032
0306-9877/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Subsequent research enabled identification and characterization of the murine homolog of CLEC12A. Known by the names Clec12a, Micl, and KLRL1, this protein was found to be expressed on granulocytes, monocytes/macrophages, dendritic cells, natural killer (NK) cells, B cells, and CD8+ T cells [6–8]. Being structurally and functionally similar to CLEC12A, this protein is also able to recruit inhibitory phosphatases upon activation, and hence act as an inhibitory receptor [8].

Recently, both CLEC12A and Clec12a were shown to recognize monosodium urate crystals (MSU), which are accepted as cardinal danger signals of dead cells [9,10].

- CLEC12A is an inhibitory C-type lectin-like receptor and negatively regulates granulocyte and monocyte functions [4,8].
- CLEC12A is expressed in a wide variety of immune system cells, innate immune system cells being the most important [4,5,7,8].
- CLEC12A is able to recognize monosodium urate crystals [9].

Innate immune system, inflammation and its regulation

For sake of simplicity, human immune system is divided into two principal components, namely the innate and the acquired immune systems. Innate immune system has anatomical barriers with physical, chemical, and biological components of defense and additionally, has cellular (e.g., dendritic cells, granulocytes, monocytes/macrophages, mast cells, NK cells, γδ T cells) and humoral (e.g., complement system, interferons, cytokines, chemokines) components [11,12].

Immune responses start with the recognition of a non-self molecule (the "self–non-self theory", infectious agents) or a damage/danger signal (the "danger theory", endogenous/self molecules) [13]. In the case of innate immunity, this recognition is achieved through pattern-recognition receptors (PRRs) (i.e., Toll-like receptors, RIG-I-like receptors, NOD-like receptors, and C-type lectin receptors) [14]. PRRs are able to recognize and interact with both pathogen-associated molecular patterns (PAMPs, components of infectious agents) and damage/danger-associated molecular patterns (DAMPs, endogenous/self molecules occurring on the occasion of cell death). While the number of identified DAMPs are increasing, one of the oldest DAMPs which is uric acid is gaining popularity [9,10]. Following PRR-ligand (i.e., PRR-PAMP, PRR-DAMP) interaction, the intracellular signaling pathways activated by PRRs lead to increased expression of inflammatory mediators which generate the inflammatory response aiming to resolve infection or tissue injury [14,15].

As a general rule, the inflammatory response is a well-coordinated, appropriate, and "calculated" reaction with beneficial effects [16]. However, an incoordinated, inappropriate or aberrant inflammatory response, as in the case of autoinflammatory diseases, may be disastrous by causing profound and severe tissue injury [17]. So it becomes evident that, during inflammation, the activation of innate immune system cells needs to be controlled. Correspondingly, it has been revealed that inflammatory responses are tightly regulated by inhibitory receptors (an example of which is CLEC12A), specific inhibitory cells, and protein or lipid mediators. It is a well-known fact that in some circumstances, activating and inhibitory receptors of innate immune system cells recognize similar/identical ligands and the net result is determined by the relative strengths of the opposing signals (Fig. 1) [18].

- Inflammation is the immune system's response to infections and/or tissue damage.
- During the development of the inflammatory response, innate immune system cells recognize infectious agents and/or endogenous danger signals through a group of receptors, collectively named as pattern-recognition receptors (PRRs) [14].

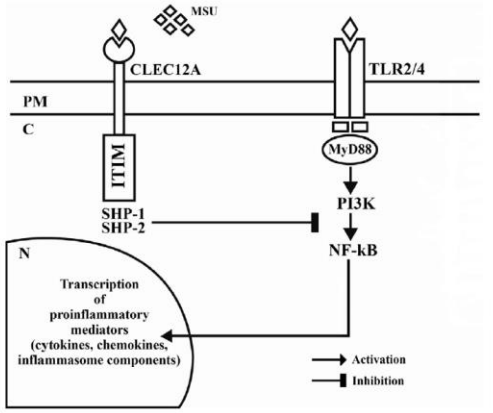


Fig. 1. Possible interaction between activatory (TLR2/4) and inhibitory (CLEC12A) pattern recognition receptors for monosodium urate crystals. In this simplified and schematized diagram, signaling pathways and interactions of activatory (TLR2/4) and inhibitory (CLEC12A) PRRs for MSU is shown. In the case of MSU engagement to both TLR2/4 and CLEC12A, the strong signal will predominate and will be the determining factor between the fate of cellular activation and the fate of cellular inhibition. C, cytoplasm; CLEC12A, C-type lectin domain family 12, member A; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; MSU, monosodium urate crystals; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; N, nucleus; NF-kB, nuclear factor kappa B; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PM, plasma membrane; SHP-1/2, SH2 domain-containing SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases; TLR2/4, Toll-like receptors 2 and 4.

- C-type lectin receptors (of which CLEC12A is a member) are among the well-known PRRs [14].
- Endogenous/self molecules capable of binding to and activating the PRRs are known as damage/danger-associated molecular patterns (DAMPs).
- Uric acid (monosodium urate crystal) is an important DAMP [9,10].
- The inflammatory response is regulated by inhibitory receptors (an example of which is CLEC12A), inhibitory cells, and inhibitory soluble mediators. The fate of the inflammatory response is determined by the balance between the activating and inhibiting factors [18].
- In autoinflammatory diseases (e.g., Behçet's syndrome, acute gouty arthritis), an aberrant, inappropriate or dysregulated intense inflammatory response is observed.

Behçet's syndrome and the exaggerated immune response to monosodium urate crystals

Behçet's syndrome (BS) is a chronic multisystemic inflammatory disorder of an unknown etiology [19]. Although mucocutaneous and ocular lesions are the most common findings, vascular, gastrointestinal, musculoskeletal and central nervous system involvement can also occur [20]. Though still incompletely understood, an exaggerated and mainly innate immune system derived inflammatory action is accepted as the pivotal pathogenic mechanism in BS [21,22].

Many of the BS patients demonstrate a type of skin hyperreactivity called the pathergy reaction (PR). Although the frequency of PR positivity varies considerably among different populations, PR is included in the criteria for diagnosis of BS [23,24]. Also, patients with BS demonstrate an exaggerated inflammatory reaction to intradermal injection of MSU (urate skin test) in a quite similar way to PR [25,26]. Interestingly, as is the case for PR, the frequency

of positivity of the skin response to MSU is varying among different populations [25].

- Behçet's syndrome (BS) is a chronic multisystemic inflammatory disorder of an unknown etiology. Currently, BS is also listed as one of the autoinflammatory diseases [21].
- Patients with BS demonstrate a characteristic skin hyperreactivity, both in the form of a pathergy reaction (following a clean skin prick) and to intradermal injection of monosodium urate crystals (urate skin test) [25,26].

Hyperuricemia, monosodium urate crystals and acute gouty arthritis

Uric acid (UA) is the end product of purine metabolism in humans and is a poorly water-soluble molecule. Hyperuricemia is variably defined as a plasma UA level >6.8–7.0 mg/dL (the approximate concentrations at which UA is supersaturated in plasma). In patients with hyperuricemia, chief complications are gout and UA urinary stones.

Gout is a disease caused by deposition of MSU in tissues, primarily in periarticular tissues and/or synovial fluid. The disease typically starts and progresses with bouts of very intense arthritis (acute gouty arthritis). As previously stated, MSU act as a DAMP recognized by PRRs both at cell membrane and cytoplasm [9,10,27]. With regard to MSU induced inflammation, inhibition and activation signals have been documented [9,28,29]. While CLEC12A mediated signal is the inhibitory one, the activation signals acting in concert result in the synthesis, processing, and release of interleukin (IL) 1β and IL-18, well-known cytokines for their potent inflammatory actions (Fig. 2) [9,30].

There is an important unresolved question on the development of gout. Although acute gouty arthritis occurs in patients with hyperuricemia and the risk of developing acute gouty arthritis parallels plasma UA levels; for any given plasma UA level, only a portion of hyperuricemic patients go on to develop this complication [31]. The underlying rationale for this fact remains to be elucidated.

- Gout is a metabolic disease characterized by hyperuricemia and deposition of monosodium urate crystals (MSU) in tissues, mainly in and around joints.
- Gout is also classified as an autoinflammatory disease by the bouts of very intense arthritis (acute gouty arthritis) it causes [29].
- Uric acid (UA) in the form of MSU, is an important damage/danger-associated molecular pattern with well-defined pattern-recognition receptors that recognize it (e.g., Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, CLEC12A) [9,10,27–30].
- Because of reasons yet unknown, for any given plasma UA level, only a portion of hyperuricemic patients go on to develop acute gouty arthritis [31].

Hypotheses

In light of the existent and the above summarized literature concerning CLEC12A, BS, and acute gouty arthritis, the following hypotheses are proposed:

1. In patients with BS, the exaggerated skin response to MSU is related to underexpression of CLEC12A.
2. By compromising the inhibitory control of innate immune system cells, decreased expression of CLEC12A in BS results in the development of a more intense inflammatory response. Through this mechanism, underexpression of CLEC12A may be underlying a more generalized pro-inflammatory immune abnormality in patients with BS.
3. In patients with hyperuricemia, decreased expression of CLEC12A is associated with the development of acute gouty arthritis.

Discussion

Autoinflammatory diseases constitute a heterogenous and growing group of clinical disorders characterized by "episodes of seemingly unprovoked inflammation without high-titer autoantibodies or antigen-specific T lymphocytes" [32]. The innate immune system with its cellular components (e.g., granulocytes, monocyte/macrophages, dendritic cells, NK cells), PRRs, and soluble mediators (e.g., interleukins, chemokines) dominates the pathogenesis of autoinflammatory diseases. Currently, both BS and gout are included in the classification schemes of autoinflammatory diseases [32,33].

Gout is a prevalent disease with a still increasing prevalence [34]. BS has a characteristic geographical distribution with high prevalences along the ancient trading route named as the Silk Road. Both diseases are known to impair the quality of life of the sufferers. Additionally, while gout appears to be an independent risk factor for cardiovascular mortality and morbidity, BS has a significant morbidity profile and is reported to be a cause of increased mortality in the young male patients [35].

Recently, Qing et al. proposed that, polymorphisms involving the innate immunity genes may confer susceptibility to gout [36]. Apprehensibly, same may be true for BS, which has a strong genetic background. Polymorphisms of CLEC12A gene may modulate its overall inhibitory action in innate immune responses.

Identifying a shared gene important for both BS and gout may provide new insights into the immunopathogenic mechanisms of these diseases, and thereby may point to new molecular targets with therapeutic implications.

The pros and cons of the hypotheses

1. **Effects of the downregulation of CLEC12A.**

It is shown that in neutrophils, the downregulation of CLEC12A enhances MSU-induced neutrophil activation [37]. Also, by conducting in vivo experiments Neumann et al. demonstrated that, following challenges with MSU or necrotic cells, Clec12a-deficient mice exhibit hyperinflammatory responses [9]. In another in vivo experiment, injection of mice with a rat anti-Clec12a monoclonal antibody resulted in an enhanced antibody production mainly through dendritic cell effects [38]. Polymorphisms of *CLEC12A* gene may adversely alter the expression, ligand binding characteristics, and ITIM functions of the protein and thereby modulate its inhibitory action in innate immune responses. Such a polymorphism with clinical implications has already been documented in an inflammatory arthritis [39].

Another mechanism instrumental in downregulating CLEC12A was previously touched on in BS. An in vivo priming of neutrophils without full activation had been suggested [40]. The same scenario assuming a state of "in vivo" neutrophil preactivation had been implicated in BS [41]. As CLEC12A is downregulated following cellular activation, the primed state of neutrophils in patients with BS may provide another explanation for the downregulation of CLEC12A [5,8,37].

2. **Behçet's syndrome, acute gouty arthritis, neutrophils, CLEC12A, and colchicine**

The hallmarks of BS are the mucocutaneous lesions and these lesions characteristically demonstrate significant neutrophil infiltrates [42]. Another cutaneous finding typically observed in BS is the PR. PR also occurs in neutrophilic dermatoses which

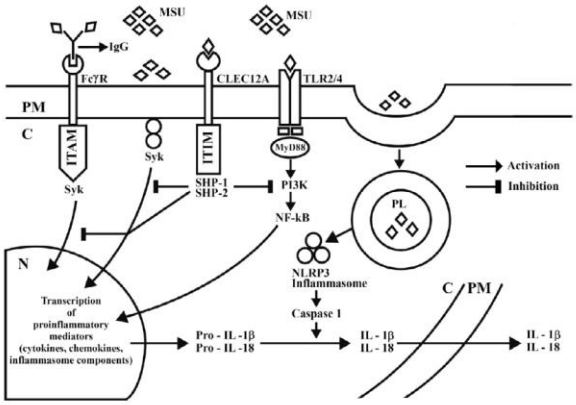


Fig. 2. The interplay between the activatory and inhibitory recognition mechanisms of monosodium urate crystals. A simplified and schematized diagram demonstrating the receptor based and direct activatory and CLEC12A mediated inhibitory recognition mechanisms of MSU and the potential interactions between them. C, cytoplasm; CLEC12A, C-type lectin domain family 12, member A; FcγR, Fc receptor for immunoglobulin G; IgG, immunoglobulin G; IL-1β, interleukin-1beta; IL-18, interleukin-18; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; MSU, monosodium urate crystals; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; N, nucleus; NF-kB, nuclear factor kappa B; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PL, phagolysosome; PM, plasma membrane; Pro-IL-1β, pro-interleukin-1beta; Pro-IL-18, pro-interleukin-18; SHP-1/2, SH2 domain-containing SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases; Syk, spleen tyrosine kinase; TLR2/4, Toll-like receptors 2 and 4.

harbor dense neutrophilic infiltrates and are now known to be autoinflammatory disease entities [43]. Acute gouty arthritis is the prototype of the crystal arthritis and is characterized by a heavy neutrophil infiltration of the involved joint [44]. Similarly, BS synovitis typically demonstrates a striking neutrophilic inflammation [45]. As such, both BS and gout are classified as autoinflammatory diseases characterized by recurrent attacks of inflammation primarily mediated by neutrophils.

CLEC12A is an inhibitory receptor expressed by neutrophils and many other innate immune system cells [4,5,7,8]. Through its cytoplasmic ITIM domain, CLEC12A is shown to inhibit neutrophil, macrophage, dendritic, and NK cell functions [4,7,37,38]. As stated above, any influence causing a downregulation of CLEC12A results in a proinflammatory state and vice versa. Colchicine is a well-known anti-inflammatory drug specifically used in three autoinflammatory diseases, namely, acute gouty arthritis, familial Mediterranean fever (FMF), and BS. Classically, the anti-inflammatory effect of colchicine is attributed to its disruption of microtubules in neutrophils, thereby impairing neutrophil chemotaxis and phagocytosis. It is also documented that colchicine has an effect on gene expression [46]. Importantly, in an MSU induced inflammation model, colchicine was shown to counteract the downregulation of CLEC12A [37]. These findings pertinent to neutrophils, CLEC12A and colchicine are in support of the hypothesis that BS and acute gouty arthritis may be sharing CLEC12A in their immunopathogenesis.

3. **Monosodium urate crystal induced inflammation in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis**

As mentioned earlier, BS patients demonstrate a characteristic cutaneous response to intradermally injected MSU (urate skin test) [25,26]. Although the frequency of positivity of this skin response is varying between different populations, to the best of our knowledge, BS is the only inflammatory disease in which an exaggerated inflammatory response to intradermal injection of MSU is observed [25,47]. In order to elucidate the mechanism of this response, Gogus et al. studied the oxidative burst reaction of neutrophils to MSU in vitro [48]. They found that, when compared to healthy controls, the oxidative burst of neutrophils and monocytes was significantly increased in patients with BS [48].

MSU are among the most potent proinflammatory stimuli for neutrophils. It is known that in acute gouty arthritis, yet incompletely understood molecular mechanisms modulate recognition of dormant periarticular/intraarticular MSU. Some of these mechanisms have been clarified and reviewed elsewhere [28,29,37,49,50]. While the activating signals for MSU are numerous, one important inhibitory receptor, namely CLEC12A is characterized [9,37]

4. **Genomewide linkage and association studies in Behçet's syndrome and the locus of *CLEC12A***

A genomewide linkage screen to identify the BS susceptibility genes revealed evidence for linkage to 15 non-HLA chromosomal regions including 12p12–13 [51]. Importantly, this region was shown to increase its importance following the addition of further markers [51]. A genomewide analysis but this time an association study, identified 6 possible genomic regions including 12p12.1 as genomic segments harboring BS susceptibility loci [52]. As can be seen, the region 12p12–13 was pointed out in both genomewide studies and the locus of *CLEC12A* which is 12p13.2 lies in close proximity to this region [3].

Recently, another genomewide association study identified an association at *KLRC4*, which is also an innate immunity gene [53]. Interestingly, *KLRC4* is located within the NK complex which contains several C-type lectin genes and *KLRC4*'s location (12p13.2–p12.3) exactly matches that of *CLEC12A*'s (12p13.2) [3,54].

5. **Differential expression of CLEC12A among patients with Behçet's syndrome**

Xavier et al. performed a comparative genomewide expression analysis between 15 BS patients and 14 healthy controls [55]. By borrowing their microarray data from Gene Expression Omnibus (GEO) database (GEO accession number GSE17114) [56], researchers at Ankara University Biotechnology Institute conducted a different analysis comparing two subsets of BS patients. According to the original data presented in the report

of Xavier et al., their 15 BS patients were grouped as either "patients without vascular involvement, mucocutaneous Behçet" (group M, $n = 11$) or "patients with vascular involvement, vasculo-Behçet" (group V, $n = 4$) for the analysis. When these two groups were compared with respect to their genomewide expression profiles, *CLEC12A* expression was found to be 2.29-fold decreased in vasculo-Behçet patients (geometric mean of intensities in group M: 187.96, geometric mean of intensities in group V: 82.04, fold change: 2.29, parametric *p*-value: 0.0012194) (Fig. 3) [57]. As vasculo-Behçet is accepted as the severe form of BS, this finding seems to support the hypothesis which states "underexpression of CLEC12A may be underlying a more generalized pro-inflammatory immune abnormality in patients with BS".

6. **Both Behçet's syndrome and gout are complex disorders**

BS and gout are complex disorders caused by the interaction between multiple genetic and environmental variables [58,59]. In the case of complex disorders, the interaction between a polygenic genetic background and multiple environmental factors seems to determine the occurence of these diseases. The polygenic background of an individual is constituted by the continuously interacting susceptibility and protection genes which are present in the genome. As such, for BS and gout, it is clearly impossible to put all the blame on CLEC12A and the facts presented in this article may point to CLEC12A only as a susceptibility/protection gene shared in the immunopathogenesis of both BS and gout.

Another important issue with regard to BS is its varying prevalence and differing disease expression around the globe. As previously stated, BS has high prevalences along the Silk Road and it is important to note that the more severe presentations of BS are cumulated in the same region [60]. A similar situation is also observed with respect to PR and urate skin test. As any specific and common environmental factor has not been identified yet, shared genetic factors (e.g., *HLA-B51* allele positivity, *CLEC12A* polymorphisms) may explain the gathering of BS, its severe forms, and PR and urate skin test positivity [61].

7. **Frequency of gout among patients with Behçet's syndrome**

At this point, an important question would be whether the prevalence of gout is increased among BS patients or not. To the best of our knowledge, there is no study reviewing the subject yet and we believe that the question is worth investigating. With regard to such a study, two important points should be kept in mind. First, as hyperuricemia is a prerequisite for developing gout, initially, UA metabolism should be investigated in patients with BS.

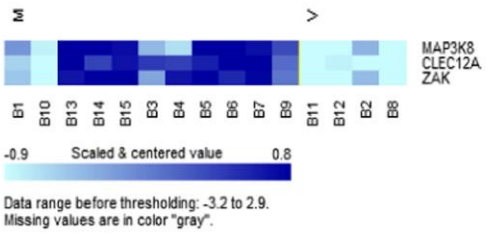


Fig. 3. Heatmap representation for the expression profiles of *CLEC12A* and two other arbitrarily selected genes (*MAP3K8* and *ZAK*) in patients with Behçet's syndrome. The heatmap displays the expression profiles of *CLEC12A* together with *MAP3K8* and *ZAK* in 15 patients with BS (B1–B15). *CLEC12A*, C-type lectin domain family 12, member A; M, mucocutaneous Behçet; *MAP3K8*, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8; V, vasculo-Behçet; *ZAK*, sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK.

Secondly, it must not be forgotten that, virtually all BS patients are receiving treatment with anti-gout medications (e.g., colchicine, glucocorticoids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) which may actually prevent the occurrence of gout in this patient population.

Future perspectives

What to do next?

The following research should be designed and conducted for the validation of our proposed hypotheses:

1. Screening, documentation and association studies of the existent polymorphisms of *CLEC12A* among populations with high and low BS prevalences.
2. Screening, documentation and association studies of the existent polymorphisms of *CLEC12A* among patients with asymptomatic hyperuricemia and patients with gout.
3. Comparative functional studies with the polymorphic variants of CLEC12A shown to be associated with BS and/or gout. These functional studies could be designed in vivo (transgenic and/or knockout mouse) or in vitro (cell culture) and at transcriptome, proteome, cell, tissue or organism levels.
4. Prevalence of hyperuricemia and potential variations in UA metabolism in patients with BS.

Implications

If our proposed hypotheses are validated through carefully designed rigorous experiments, we believe that, they may harbor important implications for therapeutic approaches, experimental model design, and elucidation of immunopathogenesis in autoinflammatory disorders including BS and gout. To mention a few;

1. Kim et al. by using decapeptides representing ITIM-like sequences demonstrated that, it is possible to inhibit the expression of inflammatory mediators with such short peptide sequences [62]. By using a similar approach, it may be possible to simulate the inhibitory function of the ITIM domain of CLEC12A. This intervention may prove to be beneficial in terms of anti-inflammatory therapy in patients with BS and gout.
2. Animal models are of great value in both elucidating the pathogenesis of diseases and for the therapeutic trials of new molecules. Up until now, there has not been a successful animal model of BS, displaying many of the clinical characteristics of the syndrome. We believe that, an *HLA-B51* transgenic and *CLEC12A* knockout animal model will prove to be very useful as an animal model of BS.
3. Control of inflammation via inhibitory receptors is an important theme in the maintenance of immune system homeostasis. Identification and characterization of the inhibitory receptors and the signaling pathways they are involved may provide important insights into the pathogenesis of autoinflammatory diseases. Being one of the recently characterized inhibitory CLEC receptors, CLEC12A has the potential to help us uncover the immune abnormalities observed in BS, gout, and presumably other inflammatory diseases.

Conclusion

CLEC12A is a C-type lectin-like pattern recognition receptor recognizing monosodium urate crystals as a danger-associated molecular pattern. Both in vivo and in vitro, CLEC12A is shown to effectively inhibit granulocyte and monocyte/macrophage functions and hence is an inhibitory receptor. Substantial amount of

evidence points to a shared immunopathogenic role of CLEC12A in Behçet's syndrome and gout. We believe that CLEC12A harbors important implications for therapy, designing experimental models, and uncovering immunopathogenic mechanisms in Behçet's syndrome and gout.

Declaration of conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interests with respect to the authorship and/or publication of this article.

Financial disclosure

No financial support was received for the research and/or authorship of this article.

References

[1] Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. FEBS J 2005;272:6179–217.
[2] Cummings RD, McEver RP. C-type lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p. 439–58.
[3] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/160364.
[4] Marshall AS, Willment JA, Lin HH, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. J Biol Chem 2004;279:14792–802.
[5] Marshall AS, Willment JA, Pyz E, et al. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. Eur J Immunol 2006;36:2159–69.
[6] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/232413.
[7] Han Y, Zhang M, Li N, et al. KLRL1, a novel killer cell lectinlike receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity. Blood 2004;104:2858–66.
[8] Pyz E, Huysamen C, Marshall AS, Gordon S, Taylor PR, Brown GD. Characterisation of murine MICL (CLEC12A) and evidence for an endogenous ligand. Eur J Immunol 2008;38:1157–63.
[9] Neumann K, Castineiras-Vilarino M, Höckendorf U, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. Immunity 2014;40:389–99.
[10] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature 2003;425:516–21.
[11] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Innate immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. Cellular and molecular immunology. Philadelphia (PA): Elsevier; 2012. p. 55–88.
[12] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Pathogens, infection, and innate immunity. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular biology of the cell. New York (NY): Garland Science; 2008. p. 1485–538.
[13] Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? Nat Immunol 2007;8:11–3.
[14] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 2010;140:805–20.
[15] Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4:a006049.
[16] Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. J Clin Invest 2008;118:413–20.
[17] Ariel A, Timor O. Hanging in the balance: endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis. J Pathol 2013;229:250–63.
[18] Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. Science 2000;290:84–9.
[19] Yazici Y, Yurdakul S, Yazici H. Behçet's syndrome. Curr Rheumatol Rep 2010;12:429–35.
[20] Yurdakul S, Yazici H. Behçet's syndrome. Best Pract Res Clin Rheumatol 2008;22:793–809.
[21] Gul A. Behçet's disease as an autoinflammatory disorder. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005;4:81–3.
[22] Kapsimali VD, Kanakis MA, Vaiopoulos GA, et al. Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. Clin Rheumatol 2010;29:1211–6.
[23] Yazici H, Chamberlain MA, Tuzun Y, Yurdakul S, Muftuoglu A. A comparative study of the pathergy reaction among Turkish and British patients with Behçet's disease. Ann Rheum Dis 1984;43:74–5.
[24] International Study Group for Behcet's Disease. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. Lancet 1990;335:1078–80.
[25] Cakir N, Yazici H, Chamberlain MA, et al. Response to intradermal injection of monosodium urate crystals in Behçet's syndrome. Ann Rheum Dis 1991;50:634–6.
[26] Flower C. Diagnosis of Behçet's disease in a non-endemic region: the utility of the urate skin test. West Indian Med J 2008;57:157–60.
[27] Liu-Bryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. Immunol Cell Biol 2010;88:20–3.
[28] Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. Arthritis Rheum 2005;52:2936–46.
[29] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature 2006;440:237–41.
[30] Akahoshi T, Murakami Y, Kitasato H. Recent advances in crystal-induced acute inflammation. Curr Opin Rheumatol 2007;19:146–50.
[31] Campion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. Am J Med 1987;82:421–6.
[32] Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. Cell 2010;140:784–90.
[33] Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Annu Rev Immunol 2009;27:621–68.
[34] Roddy E, Doherty M. Gout. Epidemiology of gout. Arthritis Res Ther 2010;12:223.
[35] Yazici H, Basaran G, Hamuryudan V, et al. The ten-year mortality in Behçet's syndrome. Br J Rheumatol 1996;35:139–41.
[36] Qing YF, Zhang QB, Zhou JG. Innate immunity functional gene polymorphisms and gout susceptibility. Gene 2013;524:412–4.
[37] Gagne V, Marois L, Levesque JM, et al. Modulation of monosodium urate crystal-induced responses in neutrophils by the myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor: potential therapeutic implications. Arthritis Res Ther 2013;15:R73.
[38] Lahoud MH, Proietto AI, Ahmet F, et al. The C-type lectin Clec12A present on mouse and human dendritic cells can serve as a target for antigen delivery and enhancement of antibody responses. J Immunol 2009;182:7587–94.
[39] Michou L, Cornelis F, Levesque JM, et al. A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2012;79:451–6.
[40] Hallett MB, Lloyds D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. Immunol Today 1995;16:264–8.
[41] Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Neutrophil activation in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 2001;19:S19–24.
[42] Cho S, Kim J, Cho SB, et al. Immunopathogenic characterization of cutaneous inflammation in Behçet's disease. J Eur Acad Dermatol Venereol 2014;28:51–7.
[43] Maalouf D, Battistella M, Bouaziz JD. Neutrophilic dermatosis: disease mechanism and treatment. Curr Opin Hematol 2015;22:23–9.
[44] Mitroulis I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1β, and gout: is there a link? Semin Immunopathol 2013;35:501–12.
[45] Canete JD, Celis R, Noordenbos T. Distinct synovial immunopathology in Behçet disease and psoriatic arthritis. Arthritis Res Ther 2009;11:R17.
[46] Ben-Chetrit E, Bergmann S, Sood R. Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. Rheumatology 2005;45:274–82.
[47] Dieppe PA, Doherty M, Papadimitriou GM. Inflammatory responses to intradermal crystals in healthy volunteers and patients with rheumatic diseases. Rheumatol Int 1982;2:55–8.
[48] Gogus F, Fresko I, Elbir Y, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H. Oxidative burst response to monosodium urate crystals in patients with Behçet's syndrome. Clin Exp Rheumatol 2005;23:S81–5.
[49] Martinon F. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. Immunol Rev 2010;233:218–32.
[50] Shi Y, Mucsi AD, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. Immunol Rev 2010;233:203–17.
[51] Karasneh J, Gul A, Ollier WE, et al. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behçet's disease. Arthritis Rheum 2005;52:1836–42.
[52] Meguro A, Inoko H, Ota M, et al. Genetics of Behçet's disease inside and outside the MHC. Ann Rheum Dis 2009;69:747–54.
[53] Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. Nat Genet 2013;45:202–7.
[54] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8302.
[55] Xavier JM, Krug T, Davatchi F, et al. Gene expression profiling and association studies implicate the neuregulin signaling pathway in Behçet's disease susceptibility. J Mol Med 2013;91:1013–23.
[56] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17114.
[57] Oguz AK, Yilmaz S, Akar N, Ozdag H, Gurler A. (Unpublished data).
[58] Gul A. Genetics of Behçet's disease: lessons learned from genomewide association studies. Curr Opin Rheumatol 2014;26:56–63.
[59] Merriman TR, Choi HK, Dalbeth N. The genetic basis of gout. Rheum Dis Clin North Am 2014;40:279–90.
[60] Yurdakul S, Yazici Y. Epidemiology of Behçet's syndrome and regional differences in disease expression. In: Yazici Y, Yazici H, editors. Behçet's syndrome. New York (NY): Springer Science+Business Media; 2010. p. 35–52.
[61] Gul A, Ohno S. Genetics of Behçet's disease. In: Yazici Y, Yazici H, editors. Behçet's syndrome. New York (NY): Springer Science+Business Media; 2010. p. 265–76.
[62] Kim JK, Lee SM, Suk K, Lee WH. Synthetic peptides containing ITIM-like domains block expression of inflammatory mediators and migration/invasion of cancer cells through activation of SHP-1 and PI3K. Cancer Invest 2012;30:364–71.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Behçet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study

Ali Kemal Oğuz[1,2]*, Seda Taşır Yılmaz[2], Çağdaş Şahap Oygür[3], Tuba Çandar[4], Irmak Sayın[1], Sibel Serin Kılıçoğlu[5], İhsan Ergün[6], Aşkın Ateş[7], Hilal Özdağ[2], Nejat Akar[8]

1 Department of Internal Medicine, Ufuk University School of Medicine, Ankara, Turkey, **2** Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey, **3** Department of Internal Medicine, Başkent University School of Medicine, Ankara, Turkey, **4** Department of Biochemistry, Ufuk University School of Medicine, Ankara, Turkey, **5** Department of Histology and Embryology, Ufuk University School of Medicine, Ankara, Turkey, **6** Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Ufuk University School of Medicine, Ankara, Turkey, **7** Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey, **8** Department of Pediatrics, TOBB University of Economics and Technology Hospital, Ankara, Turkey

* drakoguz@gmail.com

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Oğuz AK, Yılmaz ST, Oygür ÇŞ, Çandar T, Sayın I, Kılıçoğlu SS, et al. (2016) Behçet's: A Disease or a Syndrome? Answer from an Expression Profiling Study. PLoS ONE 11(2): e0149052. doi:10.1371/journal.pone.0149052

Editor: Ken Mills, Queen's University Belfast, UNITED KINGDOM

Received: December 20, 2015

Accepted: January 26, 2016

Published: February 18, 2016

Copyright: © 2016 Oğuz et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Behçet's disease (BD) is a chronic, relapsing, multisystemic inflammatory disorder with unanswered questions regarding its etiology/pathogenesis and classification. Distinct manifestation based subsets, pronounced geographical variations in expression, and discrepant immunological abnormalities raised the question whether Behçet's is "a disease or a syndrome". To answer the preceding question we aimed to display and compare the molecular mechanisms underlying distinct subsets of BD. For this purpose, the expression data of the gene expression profiling and association study on BD by Xavier et al (2013) was retrieved from GEO database and reanalysed by gene expression data analysis/visualization and bioinformatics enrichment tools. There were 15 BD patients (B) and 14 controls (C). Three subsets of BD patients were generated: MB (isolated mucocutaneous manifestations, n = 7), OB (ocular involvement, n = 4), and VB (large vein thrombosis, n = 4). Class comparison analyses yielded the following numbers of differentially expressed genes (DEGs); B *vs* C: 4, MB *vs* C: 5, OB *vs* C: 151, VB *vs* C: 274, MB *vs* OB: 215, MB *vs* VB: 760, OB *vs* VB: 984. Venn diagram analysis showed that there were no common DEGs in the intersection "MB *vs* C" ∩ "OB *vs* C" ∩ "VB *vs* C". Cluster analyses successfully clustered distinct expressions of BD. During gene ontology term enrichment analyses, categories with relevance to IL-8 production (MB *vs* C) and immune response to microorganisms (OB *vs* C) were differentially enriched. Distinct subsets of BD display distinct expression profiles and different disease associated pathways. Based on these clear discrepancies, the designation as "Behçet's syndrome" (BS) should be encouraged and future research should take into consideration the immunogenetic heterogeneity of BS subsets. Four gene groups, namely, negative regulators of inflammation (*CD69*, *CLEC12A*, *CLEC12B*, *TNFAIP3*), neutrophil granule proteins (*LTF*, *OLFM4*, *AZU1*, *MMP8*, *DEFA4*, *CAMP*), antigen processing and presentation proteins (*CTSS*, *ERAP1*), and regulators of immune response (*LGALS2*, *BCL10*, *ITCH*, *CEACAM8*,

CD36, *IL8*, *CCL4*, *EREG*, *NFKBIZ*, *CCR2*, *CD180*, *KLRC4*, *NFAT5*) appear to be instrumental in BS immunopathogenesis.

Introduction

Behçet's disease (BD) is a multisystemic inflammatory disorder with a strong and complex genetic background [1]. Now, nearly 80 years after its initial description in 1937, many important questions regarding BD still remain unanswered, not only in relation to its etiology/pathogenesis but also to its classification [2]. Besides its significant morbidity profile, BD is reported to be a cause of increased mortality among the young male patients [3].

The hallmark of BD is its recurrent mucocutaneous lesions. Nevertheless, patients with BD also display a diverse spectrum of clinical manifestations including ocular, vascular, gastrointestinal, musculoskeletal, and central nervous systems [4]. The presence of well-defined clusters/subsets of BD patients with distinctly associated manifestations of the disease, marked regional variations in the expression of BD around the globe, and the proposal stating that distinct immunological abnormalities are underlying distinct classification groups of BD raised the question whether Behçet's is "a disease or a syndrome" [4–6]. At present, despite the massive amount of available data, this question is still not answered conclusively.

The introduction of microarray technology and its implementation for whole-genome expression analysis allowed scientists to study the differentially expressed genes (DEGs) in health and disease states at a genome-wide level [7]. With such a huge amount of high-throughput expression data in hand, bioinformatic and pathway analysis tools help researchers to delineate the pathways responsible for the development of diseases. Furthermore, the accumulation of research data in public repositories (i.e., databases open to public access) creates an opportunity for meta-analysis and data mining and thus analyzing data from different perspectives and condensing it into useful information.

With the purpose of answering the question of whether BD is a disease or a syndrome, we aimed to clarify and compare the molecular mechanisms underlying different expressions of BD. In this context, we used the expression data of the key gene expression profiling and association study on BD by Xavier et al [8]. The gene expression data provided by Xavier et al was retrieved from Gene Expression Omnibus (GEO) and reanalysed by implementation of gene expression data analysis/visualization and bioinformatics enrichment tools [9]. We obtained evidence of apparent expression profile discrepancies among BD patients with distinct expressions of the disorder. Furthermore, our findings supported the potential role of four gene groups (i.e., negative regulators of inflammation, neutrophil granule proteins, antigen processing and presentation proteins, and regulators of immune response) in BD immunopathogenesis.

Materials and Methods

The gene expression profiling study by Xavier *et al*

Fifteen patients with BD all diagnosed according to the revised International Criteria and 14 healthy control subjects were enrolled in the study by Xavier et al [8, 10]. Total RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells and GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) microarrays were used for hybridization [8]. According to the specifications in its product description, the GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 array is a comprehensive whole human genome expression array which covers >47,000

transcripts for expression profiling. The study by Xavier et al was conducted and reported in accordance with the Minimum Information About Microarray Experiment (MIAME) guidelines and both the raw and the processed microarray data were deposited on GEO database with the Series ID GSE17114 [8, 9, 11, 12].

Retrieval of the microarray data

The raw microarray data of the study by Xavier et al was retrieved from GEO by using the GEO accession GSE17114 on August 25th 2015 [8, 9, 12]. The relevant file was a TAR file with the name "GSE17114_RAW" including 29 individually compressed CEL files (GSM428037.CEL.gz—GSM428065.CEL.gz).

Definition of subsets of patients with Behçet's disease

By using the principal clinical characteristics (major clinical symptoms) of BD patients briefly summarized in the article by Xavier et al, we subgrouped the BD patients according to their disease manifestations [8]. Three subsets were generated, namely, BD patients with mucocutaneous involvement (MB), BD patients with ocular involvement (OB), and BD patients with vascular involvement (VB). BD patients with isolated mucocutaneous manifestations (i.e., oral aphtosis, genital aphtosis, skin aphtosis, pseudofolliculitis, erythema nodosum, positive Pathergy test) were grouped as MB; BD patients with any kind of ocular involvement (i.e., anterior uveitis, posterior uveitis, retinal vasculitis) were grouped as OB, and BD patients demonstrating large vein thrombosis were grouped as VB. The group inclusive of all of the 15 BD patients was named as B, while the control group was given the name C.

Pre-processing of the microarray data

Before obtaining the transcriptomic-level measurements and continuing with the downstream analysis, pre-processing of the microarray data was performed using BRB-ArrayTools v4.4.1 Stable Release developed by Dr. Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team [13]. The gene expression data present as raw CEL files was collated by the data import function of BRB-ArrayTools. The Robust Multiarray Average (RMA) algorithm, including background correction, log base 2 transformation, and quantile normalization was used for normalization of the microarray data [14]. Following normalization, the replicate spots within each individual array were averaged. Finally, gene filters were implemented which excluded genes if less than 20% of the genes' expression values had at least a 1.5 fold change in either direction from the genes' median expression values or if the genes' missing expression values exceeded 50%.

Verification of the manifestation based subgrouping of Behçet's disease patients

For the verification of our manifestation based subgrouping of BD patients, an initial cluster analysis was performed. BRB-ArrayTools' built-in clustering tools, Cluster 3.0 and TreeView softwares developed by Michael Eisen and the Stanford group were used for clustering [13, 15]. A hierarchical clustering algorithm using Euclidean distance metric and average linkage was implemented and both the patients and the genes were clustered. The gene sets used for clustering were constituted from the DEGs identified during the class comparisons MB *vs* OB, MB *vs* VB, OB *vs* VB (two-sample t-test, $p \leq 0.001$, fold change ≥ 3 for MB *vs* VB and ≥ 4 for MB *vs* OB and OB *vs* VB), and MB *vs* OB *vs* VB (ANOVA, $p \leq 0.001$).

Analysis of the gene expression data

Class comparison analysis among BD and C groups were performed using BRB-ArrayTools [13]. For class comparison analysis of two classes, two-sample t-test with random variance model was implemented. DEGs were selected using a p-value $\leq$0.05 and a fold change (FC) $\geq$2. In only two cases, namely, for the class comparisons B *vs* C and MB *vs* C, an FC of $\geq$1.5 was also used. The Venn diagram representation of class comparisons was drawn with Venny 2.0.2 by Juan Carlos Oliveros [16].

The tools used (i.e., BRB-ArrayTools' built-in clustering tools, Cluster 3.0 and TreeView softwares) and the methodology implemented (i.e., hierarchical clustering using Euclidean distance metric and average linkage) for cluster analysis of the gene expression data were exactly the same as described above [13, 15]. Similarly, patients and genes were clustered together and again, the gene sets used for clustering were constituted from the DEGs identified during the class comparisons MB *vs* OB, MB *vs* VB, OB *vs* VB (two-sample t-test, p$\leq$0.001 and FC$\geq$4 for all), and MB *vs* OB *vs* VB (ANOVA, p$\leq$0.001).

Gene Ontology (GO) term enrichment analysis of the DEGs were performed with Web-Based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) and the enrichment analysis specifically focused on the sub-root of biological process (BP) [17, 18]. For the enrichment analysis of GO terms, the DEGs retrieved by the class comparisons MB *vs* C (p$\leq$0.05 and FC$\geq$1.5), OB *vs* C and VB *vs* C (p$\leq$0.05 and FC$\geq$2 for both) were implemented and the setup included the hypergeometric test, the Benjamini-Hochberg procedure for multiple test adjustment, and 2 as the minimum number of genes for a category.

The flow diagram of the study is shown in Fig 1.

Matching of the loci of the differentially expressed genes with the loci identified in the genome-wide association and the genome-wide linkage studies of Behçet's disease

In order to document the matches between the loci identified in the genome-wide association (GWA) and the genome-wide linkage (GWL) studies of BD and the loci of the DEGs defined in the present study, the linkage study by Karasneh et al, and the two association studies by Meguro et al and Kirino et al were employed [19–21]. A total of 25 non-HLA loci were included and the DEGs identified during the class comparisons MB *vs* C (p$\leq$0.05 and FC$\geq$1.5), OB *vs* C and VB *vs* C (p$\leq$0.05 and FC$\geq$2 for both) were utilized.

Statistical analysis

Demographic data analysis of the study population was carried out using the SPSS 17 software (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0, Chicago, SPSS Inc.). Ages were expressed as mean ±SD and gender as ratios (M/F). For comparing the means of two independent groups the Mann-Whitney *U* test was implemented, whereas comparison of the ratios of two independent groups was performed by the chi-square (χ2) test. p$\leq$0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Demographic and clinical characteristics

Demographic and basic clinical characteristics of the study population is presented in Table 1. The ID, GEO sample, group, gender, and age columns were reproduced from Xavier et al and GEO database (GSE17114) [8, 12]. BD patients and control subjects were similar with respect to their ages (mean±SD, B: 37.1±11.0, C: 36.7±13.5, p = 0.939) and gender (M/F ratio, B: 7/8,

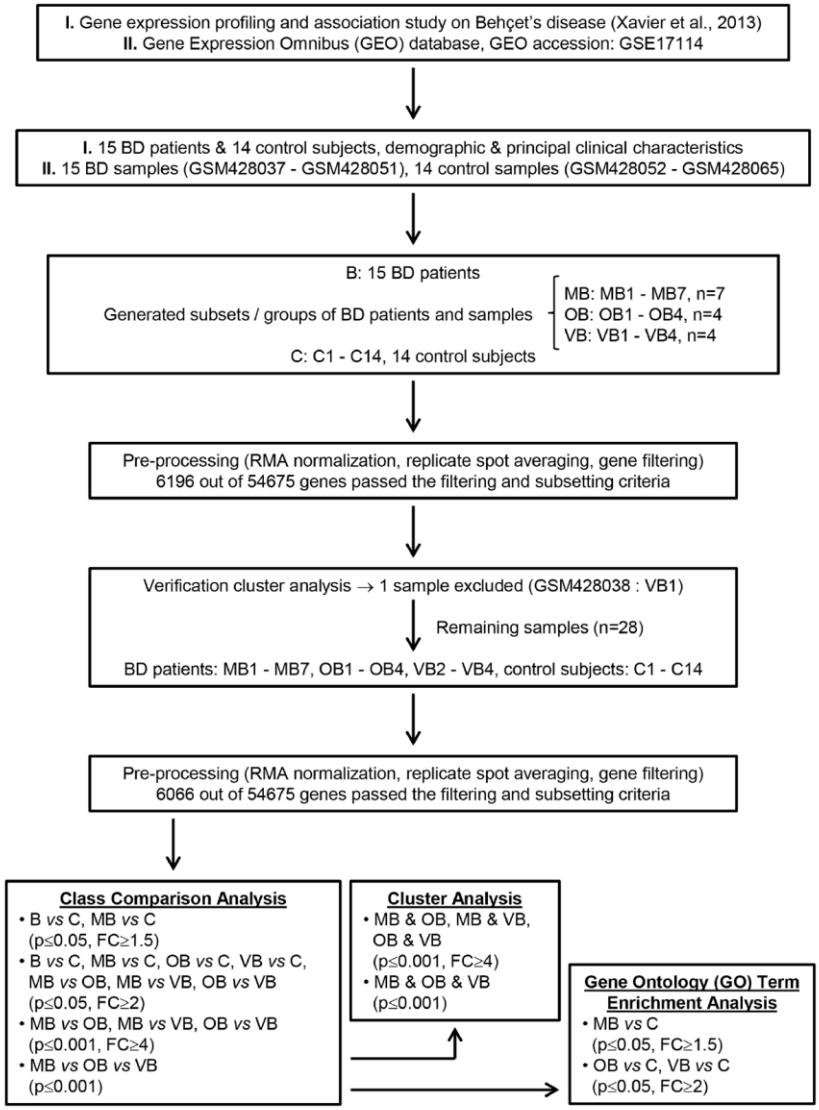


Fig 1. Flow diagram of the study. B, the group including all of the Behçet's disease patients; BD, Behçet's disease; C, control group; FC, fold change; MB, Behçet's disease patients with isolated mucocutaneous manifestations; OB, Behçet's disease patients with any kind of ocular involvement; RMA, robust multiarray average; VB, Behçet's disease patients with large vein thrombosis.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.g001

Table 1. Demographic and basic clinical characteristics of the study population.[a, b]

ID	GEO Sample	Group	Gender	Age[c]	M	O	V	BD Subset	Remarks[d]
1	GSM428037	Patient	F	29	+	-	-	Mucocutaneous	MB1
2	GSM428038	Patient	F	40	+	-	+	Vascular	VB1, Excl.[e]
3	GSM428039	Patient	F	36	+	-	-	Mucocutaneous	MB2
4	GSM428040	Patient	F	29	+	-	-	Mucocutaneous	MB3
5	GSM428041	Patient	F	55	+	-	-	Mucocutaneous	MB4
6	GSM428042	Patient	F	30	+	-	-	Mucocutaneous	MB5
7	GSM428043	Patient	F	44	+	+	-	Ocular	OB1
8	GSM428044	Patient	F	46	+	-	+	Vascular	VB2
9	GSM428045	Patient	M	20	+	-	-	Mucocutaneous	MB6
10	GSM428046	Patient	M	57	+	+	-	Ocular	OB2
11	GSM428047	Patient	M	50	+	-	+	Vascular	VB3
12	GSM428048	Patient	M	30	+	-	+	Vascular	VB4
13	GSM428049	Patient	M	33	+	+	-	Ocular	OB3
14	GSM428050	Patient	M	29	+	-	-	Mucocutaneous	MB7
15	GSM428051	Patient	M	28	+	+	-	Ocular	OB4
16	GSM428052	Control	F	27	-	-	-	-	C1
17	GSM428053	Control	F	32	-	-	-	-	C2
18	GSM428054	Control	F	62	-	-	-	-	C3
19	GSM428055	Control	F	51	-	-	-	-	C4
20	GSM428056	Control	F	26	-	-	-	-	C5
21	GSM428057	Control	F	26	-	-	-	-	C6
22	GSM428058	Control	F	46	-	-	-	-	C7
23	GSM428059	Control	M	35	-	-	-	-	C8
24	GSM428060	Control	M	42	-	-	-	-	C9
25	GSM428061	Control	M	31	-	-	-	-	C10
26	GSM428062	Control	M	28	-	-	-	-	C11
27	GSM428063	Control	M	61	-	-	-	-	C12
28	GSM428064	Control	M	26	-	-	-	-	C13
29	GSM428065	Control	M	21	-	-	-	-	C14

BD, Behçet's disease; C, control group; GEO, Gene Expression Omnibus; M, mucocutaneous manifestations; MB, Behçet's disease patients with isolated mucocutaneous manifestations; O, ocular manifestations; OB, Behçet's disease patients with any kind of ocular involvement; V, large vein thrombosis; VB, Behçet's disease patients with large vein thrombosis.

[a] The ID, GEO sample, group, gender, and age columns are reproduced from Xavier et al and GEO database (GSE17114) [8, 12].

[b] Clinical manifestations (M, O, and V) are adapted from Xavier et al and BD subsets are assigned according to these clinical manifestations [8].

[c] Age-at-evaluation.

[d] Sample/experiment names are given in the "Remarks" column.

[e] Excluded based on initial verification cluster analysis results.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t001

C: 7/7, p = 0.858). There were 7 (MB1-MB7), 4 (OB1-OB4), and 4 (VB1-VB4) patients in the MB, OB, and VB subsets respectively, whereas 14 (C1-C14) subjects in group C.

Verification cluster analysis

During initial clustering, the sample with the experiment name VB1 (study ID 2, GEO accession number GSM428038) appeared to belong to a different BD subset (i.e., MB) instead of its originally assigned BD subset (i.e., VB). The dendrogram and heatmap representations of the clustering experiments "MB & VB" and "MB & OB & VB" are depicted in Fig 2. Subsequently,

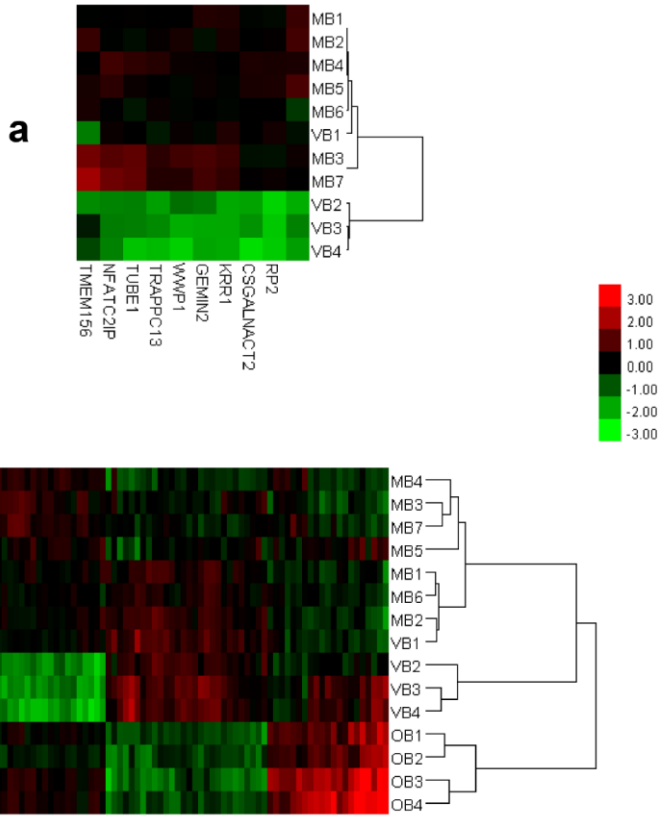


Fig 2. Dendrogram and heatmap representations of the results of the initial cluster analysis "MB & VB" (a) and "MB & OB & VB" (b). For both cases, hierarchical clustering using Euclidean metric and average linkage was employed and both patients and genes were clustered. For sake of simplicity, only the dendrograms for clustering of the patients are shown in the heatmaps. Take note of the position of VB1 (study ID 2, GSM428038) in the MB branch of the dendrograms. Based on these clustering results, VB1 was excluded prior to further analysis. Also, as can be seen in the figure, the cluster analysis successfully clustered distinct expressions of Behçet's disease and with the exception of VB1, the expression profiling based clustering results were in accordance with the manifestation based clustering of Behçet's disease patients. The gene sets used for clustering were constituted from the DEGs identified during the corresponding class comparisons (i.e., MB *vs* VB and MB *vs* OB *vs* VB).

doi:10.1371/journal.pone.0149052.g002

this sample was excluded prior to further analysis and thus the number of samples in group B and VB dropped to 14 and 3 respectively. Except the case with VB1, the expression profiling based clustering results exactly matched the manifestation (clinical) based clustering of BD patients.

The experiment descriptor file (EDF) of the study is given in the S1 File, while the gene lists used for initial clustering are presented in the S2 File.

Class comparison analysis

The number of the DEGs found during class comparison analysis between BD and C groups are summarized in Table 2. The class comparison B *vs* C yielded a DEG number of 4 and when an FC of ≥1.5 was implemented, the number of the DEGs increased to 20. Similarly, the class comparison MB *vs* C also documented a very low number of DEGs (i.e., 5) which increased to 71 again with an FC of ≥1.5. Interestingly, class comparison analysis between the two other BD subsets and C (i.e., OB *vs* C and VB *vs* C) and also class comparison analysis of BD subsets among themselves yielded significantly higher numbers of DEGs (Table 2). The number of the DEGs for class comparisons OB *vs* C, VB *vs* C, MB *vs* OB, MB *vs* VB, and OB *vs* VB were 151, 274, 215, 760, and 984 respectively. The gene lists of the DEGs are presented in the S3 File.

The Venn diagram representation of the class comparisons MB *vs* C, OB *vs* C, and VB *vs* C is shown in Fig 3. As can be seen in Fig 3, the number of the common DEGs in the intersection of MB *vs* C and OB *vs* C and VB *vs* C is zero.

The top 20 DEGs with respect to their FC values are listed in Table 3 with their gene symbols, probe set IDs, FC and p values. Worthy of note, while the absolute maximum and minimum FC values of the top 20 DEGs of the class comparison MB *vs* C were between 2.49 and 1.52, they were between 7.37 and 2.83 for OB *vs* C, and 6.31 and 2.66 for VB *vs* C. Another particularly important finding was the appearance of *Epiregulin* (*EREG*) in the top 20 DEGs list since it was a key finding of Xavier et al and was also among the "top genes differentially expressed between BD cases and controls" in their study (Table 3) [8].

Cluster analysis

The results of the cluster analysis are displayed in Fig 4. The number of the DEGs present in each of the gene sets employed during clustering of MB & OB, MB & VB, OB & VB, and MB & OB & VB groups were 11, 24, 13, and 373 respectively. As Fig 4 shows, the clustering algorithm and the gene sets employed for clustering successfully clustered distinct expressions of BD, namely, MB, OB, and VB. The gene lists of the DEGs used for clustering are presented in the S4 File.

Gene Ontology term enrichment analysis

Summary of the key findings of the GO term enrichment analysis is presented in Table 4. For each class comparison (i.e., MB *vs* C, OB *vs* C, and VB *vs* C), the top 10 GO categories with

Table 2. Summary of key results of the class comparison analysis.

Compared Classes	Number of Differentially Expressed Genes					
	p≤0.05, FC≥1.5			p≤0.05, FC≥2.0		
	Total	Increased[a]	Decreased[b]	Total	Increased[a]	Decreased[b]
B *vs* C	20	9	11	4	2	2
MB *vs* C	71	48	23	5	1	4
OB *vs* C	-	-	-	151	47	104
VB *vs* C	-	-	-	274	53	221
MB *vs* OB	-	-	-	215	128	87
MB *vs* VB	-	-	-	760	626	134
OB *vs* VB	-	-	-	984	481	503

B, the group including all of the Behçet's disease patients; FC, fold change.

[a] Increased expression in the first class (e.g., B) with respect to the second class (e.g., C).

[b] Decreased expression in the first class (e.g., B) with respect to the second class (e.g., C).

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t002

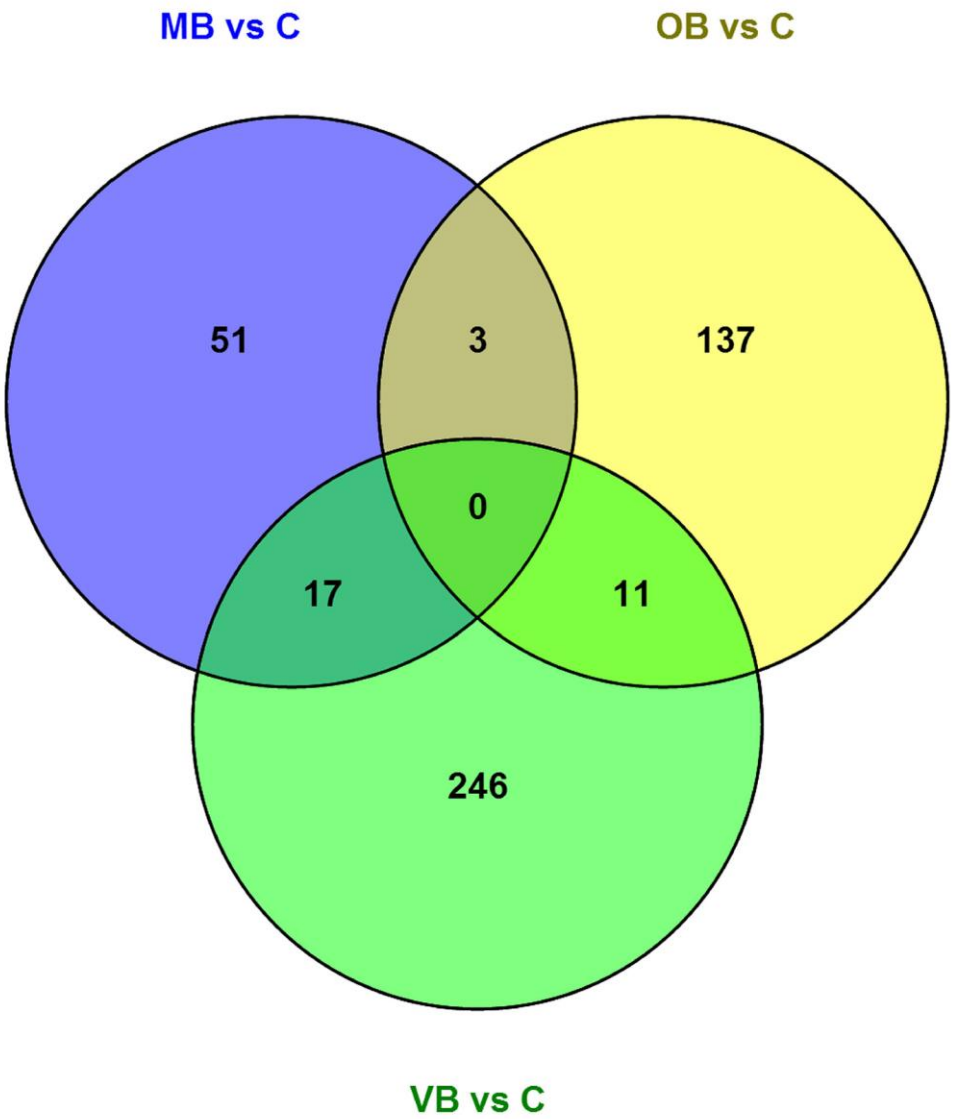


Fig 3. Venn diagram representation of the class comparisons MB *vs* C, OB *vs* C, and VB *vs* C. The number of the common DEGs present in the intersections are shown on the figure. Note that, the intersection "MB *vs* C" ∩ "OB *vs* C" ∩ "VB *vs* C" has no common DEGs. The gene lists of the intersections are as follows: "MB *vs* C" ∩ "OB *vs* C": *LTF*, *OLFM4*, *CEACAM8*; "MB *vs* C" ∩ "VB *vs* C": *HBG1*, *TMEM66*, *LGALS2*, *SEC24D*, *BCL10*, *EIF1AX*, *MAP3K4*, *KRR1*, *RP2*, *ABO*, *ATF1*, *TAX1BP1*, *CD69*, *TLR4*; "OB *vs* C" ∩ "VB *vs* C": *PRKCQ*, *TNFAIP3*, *DDX17*, *SLC6A8*, *RGS1*, *NR4A2*, *G0S2*, *OSM*. Missing counts in the gene lists occur because of recurring gene symbols and/or probe sets without assigned symbols.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.g003

Table 3. The top 20 most differentially expressed genes in the class comparison analysis.[a]

	Increased[b]				Decreased[c]			
	Gene Symbol	Probe Set ID	FC	p	Gene Symbol	Probe Set ID	FC	P
MB *vs* C[d]								
1	*PMAIP1*	204286_s_at	1.95	0.01768	*LTF*	202018_s_at	-2.49	0.01236
2	*RP2*	205191_at	1.93	0.03448	*CEACAM8*	206676_at	-2.16	0.02634
3	*CTSS*	202901_x_at	1.89	0.04829	*OLFM4*	212768_s_at	-1.67	0.01988
4	*LGALS2*	208450_at	1.85	0.01606	*KIAA0907*	230028_at	-1.65	0.01763
5	*BCL10*	1557257_at	1.78	0.02045	*YPEL3*	232077_s_at	-1.63	0.01782
6	*SEC24D*	202375_at	1.77	0.01648	*STK24*	215188_at	-1.62	0.01275
7	*NUCKS1*	222027_at	1.77	0.02384	*CD36*	209555_s_at	-1.55	0.00281
8	*CD69*	209795_at	1.70	0.04193	*AZU1*	214575_s_at	-1.55	0.02322
9	*ITCH*	235057_at	1.69	0.01707	*VASH1*	1556423_at	-1.53	0.00848
10	*MYLIP*	228097_at	1.68	0.00678	*ATG16L2*	229389_at	-1.52	0.02743
OB *vs* C[e]								
1	*MMP8*	231688_at	6.09	0.00004	*CTCF*	214349_at	-7.37	0.00037
2	*LTF*	202018_s_at	5.23	0.00066	*IL8*	211506_s_at	-6.16	0.02745
3	*OLFM4*	212768_s_at	4.86	0.00013	*TMEM107*	224496_s_at	-4.50	0.00113
4	*CEACAM8*	206676_at	4.84	0.00156	*RGS1*	202988_s_at	-3.90	0.01328
5	*CA1*	205950_s_at	3.53	0.01229	*G0S2*	213524_s_at	-3.19	0.01272
6	*CRISP3*	207802_at	3.41	0.00140	*CCL4*	204103_at	-3.06	0.01276
7	*AHSP*	219672_at	2.99	0.02106	*RHOH*	236293_at	-2.97	0.00020
8	*DEFA4*	207269_at	2.98	0.01174	*SRSF3*	232392_at	-2.91	0.00058
9	*LCN2*	212531_at	2.96	0.00019	*TNFAIP3*	202643_s_at	-2.84	0.00319
10	*CHI3L1*	209395_at	2.88	0.00006	*CDC42SE2*	229026_at	-2.83	0.00800
VB *vs* C[e]								
1	*HBM*	240336_at	3.35	0.01314	*EREG*	205767_at	-6.31	0.03990
2	*AMFR*	202203_s_at	3.29	0.02310	*NR4A2*	216248_s_at	-5.87	0.00605
3	*HBD*	206834_at	3.15	0.02727	*RGS1*	202988_s_at	-5.31	0.00868
4	*SLC25A37*	228527_s_at	2.97	0.00279	*CD69*	209795_at	-4.04	0.00076
5	*ALAS2*	211560_s_at	2.84	0.04500	*G0S2*	213524_s_at	-3.81	0.01691
6	*SNCA*	204467_s_at	2.79	0.00489	*S100B*	209686_at	-3.66	0.00573
7	*SRSF6*	206108_s_at	2.72	0.02661	*MAFF*	36711_at	-3.57	0.00709
8	*PDZK1IP1*	219630_at	2.67	0.03309	*SERPINB2*	204614_at	-3.51	0.01877
9	*EPB42*	210746_s_at	2.67	0.04710	*EID1*	211698_at	-3.35	0.00688
10	*KRT1*	205900_at	2.66	0.00349	*GALNACT2*	218871_x_at	-3.24	0.00252

[a] Only the results of the comparisons MB *vs* C, OB *vs* C, and VB *vs* C are presented.

[b] Increased expression in the first class (e.g., MB) with respect to the second class (e.g., C).

[c] Decreased expression in the first class (e.g., MB) with respect to the second class (e.g., C).

[d] For the class comparison MB *vs* C, p and FC were $\leq$0.05 and $\geq$1.5 respectively.

[e] For the class comparisons OB *vs* C and VB *vs* C, p and FC were $\leq$0.05 and $\geq$2.0 respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t003

respect to their enrichment scores are listed in the table. The comprehensive results of the GO term enrichment analysis are given in the S5–S7 Files. Remarkably, several GO categories with relevance to interleukin-8 (IL-8) production (for MB *vs* C) and immune response to microorganisms (for OB *vs* C) were enriched. Additionally, biological processes of cytokine production regulation, leukocyte activation, and immune response gained substantial prominence.

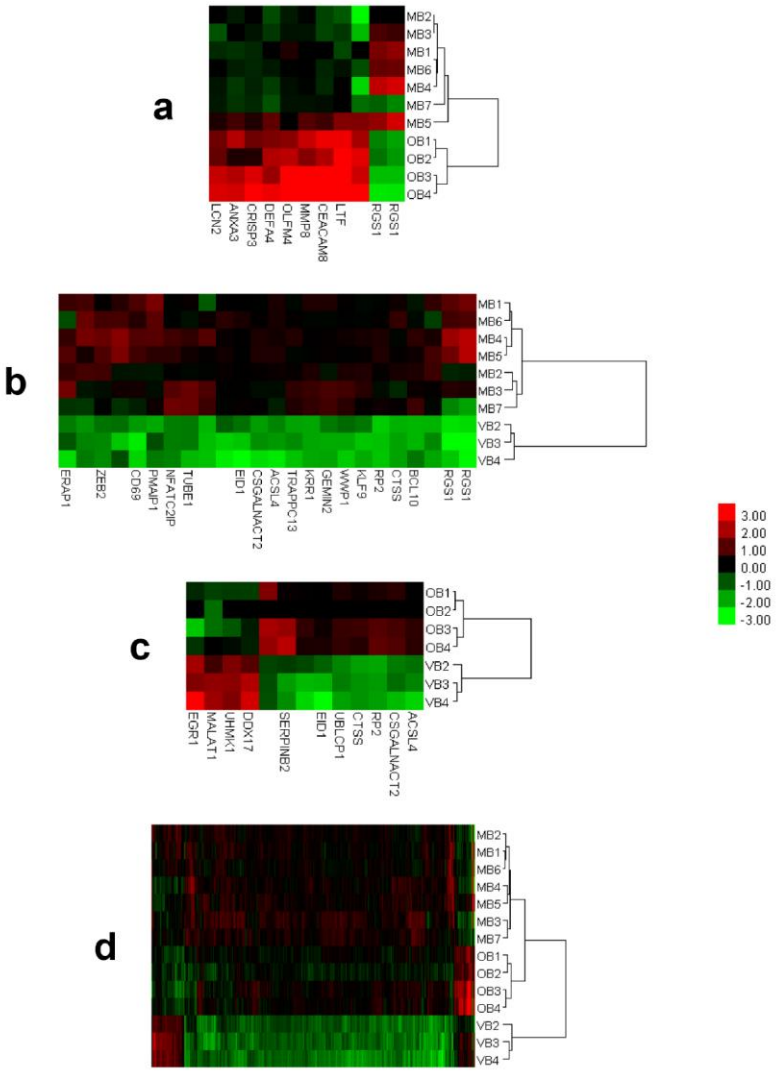


Fig 4. Dendrogram and heatmap representations of the results of the cluster analysis "MB & OB" (a), "MB & VB" (b), "OB & VB" (c), and "MB & OB & VB" (d). For every case, hierarchical clustering using Euclidean metric and average linkage was employed and both patients and genes were clustered. For ease of demonstration, only the dendrograms for clustering of the patients are shown in the heatmaps. As the figure shows, the algorithm and the gene sets implemented successfully clustered distinct expressions of Behçet's disease. The gene sets used for clustering were constituted from the DEGs identified during the corresponding class comparisons (i.e., MB *vs* OB, MB *vs* VB, OB *vs* VB, and MB *vs* OB *vs* VB).

doi:10.1371/journal.pone.0149052.g004

Table 4. Summary of key findings of the Gene Ontology term enrichment analysis.[a, b, c]

GO Category	GO ID	G	O	E	R	Raw p	Adj p
MB *vs* C[d]							
Positive regulation of myeloid leukocyte cytokine production	0061081	8	3	0.02	143.25	9.14e-07	0.0003
Regulation of interleukin-8 biosynthetic process	0045414	12	3	0.03	95.50	3.57e-06	0.0003
Interleukin-8 biosynthetic process	0042228	13	3	0.03	88.15	4.63e-06	0.0003
Regulation of cytokine production involved in immune response	0002718	39	4	0.10	39.18	3.05e-06	0.0003
Regulation of interleukin-8 production	0032677	40	4	0.10	38.20	3.38e-06	0.0003
Innate immune response (GO:0045087); Defense response (GO:0006952); Regulation of cytokine production (GO:0001817); Immune response (GO:0006955); Immune system process (GO:0002376).							
OB *vs* C[e]							
Response to bacterium	0009617	319	10	2.11	4.74	4.77e-05	0.0047
Leukocyte activation	0045321	537	15	3.55	4.22	2.18e-06	0.0005
Response to other organism	0051707	547	15	3.62	4.14	2.73e-06	0.0005
Response to biotic stimulus	0009607	574	15	3.80	3.95	4.92e-06	0.0008
Immune response	0006955	1006	25	6.66	3.76	4.49e-09	2.23e-06
Immune system process (GO:0002376); Defense response (GO:0006952); Positive regulation of metabolic process (GO:0009893); Positive regulation of cellular process (GO:0048522); Positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604).							
VB *vs* C[e]							
Protein modification process	0036211	2409	57	29.60	1.93	2.39e-07	0.0001
Cellular protein modification process	0006464	2409	57	29.60	1.93	2.39e-07	0.0001
Macromolecule modification	0043412	2501	57	30.74	1.85	8.57e-07	0.0002
Cellular protein metabolic process	0044267	3150	69	38.71	1.78	1.31e-07	0.0001
Protein metabolic process	0019538	3730	75	45.84	1.64	9.45e-07	0.0002
Single-organism metabolic process (GO:0044710); Cellular metabolic process (GO:0044237); Organic substance metabolic process (GO:0071704); Metabolic process (GO:0008152); Macromolecule metabolic process (GO:0043170).							

Adj, adjusted (by the multiple test adjustment); E, the expected number of genes in the category; G, the number of reference genes in the category; GO, gene ontology; O, the number of genes in the gene set and also in the category; R, ratio of enrichment.

[a] For each class comparison, the top 10 GO categories with respect to their enrichment scores are presented.

[b] For the 6th to 10th GO categories, only the GO category names and the GO IDs are listed.

[c] The GO term enrichment analysis specifically focused on the sub-root of biological process.

[d] For the class comparison MB *vs* C, p and FC were $\leq$0.05 and $\geq$1.5 respectively.

[e] For the class comparisons OB *vs* C and VB *vs* C, p and FC were $\leq$0.05 and $\geq$2.0 respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t004

Matching of the differentially expressed genes' loci with the loci identified in the genome-wide association and the genome-wide linkage studies of Behçet's disease

The matches between the loci identified in the GWA and the GWL studies of BD and the loci of the DEGs documented in the present study are listed in Table 5. A total of 25 non-HLA loci are included and although 5 of the GWAS/GWLS loci (i.e., 1p31.3, 2q32.2-q32.3, 10q24, 16q12, 22q11.22) had no corresponding DEGs, the remaining 20 loci hosted a total of 51 matching DEGs (range 1–6). Interestingly and importantly, congruous with the findings of Kirino et al, *ERAP1* (5q15), *KLRC4* (12p13.2-p12.3), and *CCR2* (3p21) were among the matching DEGs (Table 5) [21].

Discussion

For BD, the appropriateness of the use of "Behçet's syndrome" instead of "Behçet's disease" has been previously suggested [22, 23]. In support of this recommendation, it was proposed by

Table 5. Matches between the loci identified in the genome-wide association and the genome-wide linkage studies of Behçet's disease and the loci of the differentially expressed genes documented in the present study.[a]

GWAS/GWLS Loci	Differentially Expressed Genes with Overlapping Loci	Remarks
1p31.3[b]	-	-
1p36[c]	*SRSF10*, *EIF4G3*	VB *vs* C
1q31-q32[b]	*NUCKS1*, *CHI3L1*, *RGS1*, *G0S2*, *ELK4*, *ZNF281*	MB *vs* C, OB *vs* C, VB *vs* C
2q32.2-q32.3[b]	-	-
3p12[d]	*NFKBIZ*	OB *vs* C
3p21[b]	*LTF*, *PBRM1*, *CAMP*, *CCR2*	MB *vs* C, OB *vs* C, VB *vs* C
4p15[c]	*DCAF16*	VB *vs* C
5q12[c]	*TRAPPC13*, *SREK1IP1*, *CD180*, *CENPK*	VB *vs* C
5q15[b]	*ELL2*, *TTC37*, *ERAP1*	MB *vs* C, VB *vs* C
5q23[c]	*HBEGF*	VB *vs* C
6q16[c]	*MANEA*, *UFL1*	MB *vs* C, VB *vs* C
6q25-26[c]	*TULP4*, *SYTL3*	Significant locus[c, d], OB *vs* C
6q25.1[d]	*PPIL4*	VB *vs* C
7p21[c]	*ARL4A*, *UMAD1*	MB *vs* C, VB *vs* C
10q24[c]	-	-
12p12-13[c]	*CD69*, *CCND2*, *PTPRO*, *SLC2A3*	Significant locus[c, d], MB *vs* C, OB *vs* C, VB *vs* C
12p12.1[d]	*BCAT1*, *ETNK1*	OB *vs* C, VB *vs* C
12p13.2-p12.3[b]	*CLEC12A*, *CLEC12B*, *KLRC4*	MB *vs* C, OB *vs* C, VB *vs* C
12q13[c]	*RPAP3*, *ATF1*, *PCBP2*, *SLC16A7*, *KRT1*	MB *vs* C, OB *vs* C, VB *vs* C
16q12[c]	-	-
16q21-23[c]	*CTCF*, *NFAT5*, *AMFR*	OB *vs* C, VB *vs* C
17p13[c]	*TMEM107*, *PER1*	OB *vs* C, VB *vs* C
20q12-13[c]	*SLMO2*, *SRSF6*	VB *vs* C
22q11.22[d]	-	-
Xq26-28[c]	*SLC6A8*	OB *vs* C, VB *vs* C

GWAS, genome-wide association study; GWLS, genome-wide linkage study.

[a] Only the non-HLA loci are listed.

[b] Kirino et al, 2013 [21].

[c] Karasneh et al, 2005 [19].

[d] Meguro et al, 2009 [20].

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t005

Lehner et al that distinct immunological abnormalities were underlying distinct classification groups of BD [6]. To date, the epidemiological basis of and the genetic linkage in BD has been pretty well studied. Nevertheless, in the era of "multi-omics", omics data, particularly genome-wide transcription data is scarce in BD. In the present study, by borrowing the expression profiling data of Xavier et al and implementing a "data mining" approach, it was demonstrated that: (1) BD patients demonstrate distinct expression profiles in distinct disease subsets; (2) Different disease associated pathways seem to be functional in different disease expressions of BD; and (3) Four functionally related gene groups, namely, negative regulators of inflammation, neutrophil granule proteins, antigen processing and presentation proteins, and regulators of immune response are differentially expressed in BD patients with respect to healthy controls [8].

The immunological aberrations underlying the clinical manifestations of BD is comprehensively studied and reviewed elsewhere [24, 25]. As previously stated, BD is a chronic relapsing multisystemic inflammatory disorder with a strong genetic background. HLA-B51 allele, a MHC class I gene, is shown to be a causal risk determinant for BD. Infectious agents including

Table 6. Potentially significant differentially expressed genes with immune/inflammatory functions.[a]

Symbol	Function[b]	BD Subset (s)[c]	Remarks[d]
Negative regulators of inflammation			
CD69	(-) regulation of inflammation, leukocyte activation marker	VB (↓), MB (↑)	Locus: 12p12-13, CLEC
CLEC12A	(-) regulator of granulocyte and monocyte function	MB (↑)	Locus: 12p13.2, CLEC
CLEC12B	Inhibitory receptor of myeloid cells	OB (↑)	Locus: 12p13.2, CLEC
TNFAIP3	Potent inhibitor of NF-κB signaling pathway	VB (↓), OB (↓)	Loss-of-function mutations resemble BD
Neutrophil granule proteins			
AZU1	Antimicrobial, chemotactic, inflammatory	MB (↓)	
CAMP	Antimicrobial, chemotaxis, inflammatory	OB (↑)	Locus: 3p21.3
DEFA4	Antimicrobial, corticostatic	OB (↑)	
LTF	Antimicrobial, anti-inflammatory	OB (↑), MB (↓)	Locus: 3p21.31
MMP8	Inflammatory, collagen degrading	OB (↑)	
OLFM4	(-) regulator of neutrophil bactericidal activity	OB (↑), MB (↓)	
Antigen processing and presentation			
CTSS	Antigenic protein degradation, elastase	MB (↑)	
ERAP1	Antigenic protein degradation	VB (↓)	Locus: 5q15
Regulators of immune response			
BCL10	Activation of NF-κB signaling pathway, B and T cell receptors signaling pathways	VB (↓), MB (↑)	
CCL4	Chemokine, inflammatory	OB (↓)	
CCR2	Chemokine receptor, inflammatory	VB (↑)	Locus: 3p21.31
CD36	Receptor for cell adhesion and oxLDL, inflammatory	MB (↓)	
CD180	Pathogen receptor, TLR, inflammatory	VB (↑)	Locus: 5q12
CEACAM8	Receptor for cell adhesion	OB (↑), MB (↓)	
CXCL8	Chemokine, inflammatory (neutrophilic)	OB (↓)	
EREG	Inflammation, wound healing	VB (↓)	Among the top DEGs in the study of Xavier et al[e]
ITCH	Regulation of immune response	MB (↑)	Works with *TNFAIP3*, mutations cause autoimmunity
KLRC4	NK cell MHC recognition receptor	VB (↓)	Locus: 12p13.2-p12.3, CLEC
LGALS2	Lymphotoxin binding lectin	VB (↑), MB (↑)	Lectin
NFAT5	Activated T cell transcription factor, inflammatory	OB (↓)	Locus: 16q22.1
NFKBIZ	Regulation of immune response	OB (↓)	Locus: 3p12-q12

CLEC, C-type lectin; DEGs, differentially expressed genes.

[a] During preparation of the table, the top 20 most differentially expressed genes (Table 3) and the differentially expressed genes featuring genomic loci matching with the loci identified in the genome-wide association and the genome-wide linkage studies of Behçet's disease (Table 5) were reviewed.

[b] Not a comprehensive list of functions is presented.

[c] Behçet's disease subsets with differential expression of the mentioned gene and the direction of change (in brackets) are listed.

[d] Important genomic loci, prominent gene groups, and significant disease associations are given in the "Remarks" column.

[e] Xavier et al, 2013 [8].

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t006

some common bacteria (e.g., streptococci) and viruses (e.g., HSV) seem to have a role in triggering the immune responses in BD patients [24, 25]. While neutrophil leukocyte hyperactivity is a well-documented and central theme in BD, γδ T lymphocytes, which have functions in both innate and adaptive immune responses show distinct expansion patterns during periods

of increased BD activity [24, 25]. With regard to adaptive immune responses, increased levels of IL-12 and a consequent Th1 response is characteristic of BD and human heat shock proteins seem to be targets for adaptive immune responses as a result of their homologies with certain streptococcal and/or mycobacterial peptides [24, 25]. Although not implicated in disease pathogenesis, various autoantibodies (e.g., antibodies against α-enolase, α-tropomyosin, kinectin) are also detected in certain subsets of BD patients [24]. Finally, endothelial cell injury is another important heading in the immunopathogenesis of BD which probably is responsible for the well-known prothrombotic state of this disorder [24].

Before going deep into the discussion of the findings, it is necessary to touch on the aberrant behaviour of the sample VB1. This 40 year old female patient with a BD diagnosis of 5 years duration was reported to demonstrate "oral and genital aphtosis, pseudofolliculitis, erythema nodosum, and large vein thrombosis" as her "major clinical symptoms" and therefore was subgrouped as VB initially [8]. Unexpectedly, during initial verification cluster analysis, VB1 consistently clustered with MB (Fig 2). As a potential explanation for this finding, we propose the possible association of a hereditary and/or acquired hypercoagulable state as the primal cause of vascular thrombosis in this mucocutaneous BD patient. It is a well-documented fact that various hypercoagulable states associated with increased risk of thrombosis contribute to the intrinsic prothrombotic state of BD [26]. Therefore, in the case of VB1 a search for thrombophilia seems relevant and may prove worthwhile.

The results of the class comparison analysis revealed strong evidences of an immunogenetic heterogeneity in different disease expressions of BD. First of all, pooling and collectively comparing the BD patients with controls (i.e., B *vs* C) seemed to have a pronounced attenuating effect on the number of DEGs (Table 2). Conversely, the class comparisons of BD subsets both with C and among themselves yielded substantially increased number of DEGs (Table 2). When taken together, these two findings point to a reciprocal gene expression pattern in different subsets of BD patients which was exactly the case for some of the DEGs (e.g., *CD69*, *LTF*, *CEACAM8*, *OLFM4*) as documented in Tables 3 and 6. This pattern of opposite immunological findings is a well-known concept in BD (e.g., conflicting reports of increased, normal or decreased neutrophil functions) [27].

When taken together with the relatively limited number of DEGs found in the class comparison MB *vs* C, the modest FC values observed may implicate that, among BD subsets, MB has the least difference in gene expression patterns compared to controls (Tables 2 and 3). Consistently, BD patients with only the mucocutaneous manifestations of the disease are widely recognized as having the mildest presentation of the disease.

Another evidence of immunogenetic heterogeneity came from the Venn diagram analysis of the class comparisons. As shown in Fig 3, the number of the common DEGs in the binary intersections of the class comparisons were markedly limited (i.e., 3, 17, and 11), while the same number in the intersection "MB *vs* C" ∩ "OB *vs* C" ∩ "VB *vs* C" was zero. This was a striking finding demonstrating that not even a single DEG was shared among the class comparisons of BD subsets with C; again indicating an important degree of pathogenetic heterogeneity among BD subsets.

An additional evidence was provided by the results of the cluster analysis. Using a gene set of 373 DEGs (ANOVA, $p \leq 0.001$), the clustering experiment effectively clustered BD patients into three clusters which exactly matched the manifestation based clusters of BD patients (Fig 4). The chosen level of significance, the number of the DEGs employed, and the success of clustering offered supporting evidence for an immunogenetic heterogeneity in distinct disease expressions of BD.

The results of the GO term enrichment analysis were also supportive. It appeared that GO categories with relevance to IL-8 production (MB *vs* C) and immune response to

microorganisms (OB *vs* C) were prominently and differentially enriched (Table 4). IL-8, which is also known as "neutrophil chemotactic factor", plays a central role in neutrophil functions by inducing both chemotaxis and phagocytosis [28]. The mucocutaneous lesions (e.g., Pathergy reaction, pustular folliculitis) which are the hallmarks of BD, characteristically demonstrate significant neutrophilic infiltrates [29–31]. Additionally, IL-8 has previously shown to be increased in BD patients [32, 33]. Thus, enrichment of the GO terms relevant to IL-8 production was consistent with the literature.

Infectious agents, especially streptococci have long been pointed to as etiologic/triggering factors in BD [2, 34–37]. With regard to an infectious etiology, an indirect mechanism involving heat shock proteins (HSP) and a cross-reactivity/molecular mimicry etiology have been postulated among many others [38]. An important potential link between ocular involvement in BD and the streptococci may be the streptococcus-related *bes-1* gene derived peptides, which are shown to demonstrate a high level of homology with human retinal protein Brn-3b and HSP60 [39, 40]. As such, it was noteworthy to find the immune response to microorganisms related GO categories enriched for the class comparison OB *vs* C.

Although many different definitions exist, "disease" can be defined as "a definite pathological process having a characteristic set of symptoms and signs" while "syndrome" as "the aggregate of symptoms and signs associated with any morbid process" [41, 42]. While currently no molecular level differentation of the terms "disease" and "syndrome" is possible, as authors we strongly recommend the preference of "Behçet's syndrome" (BS) instead of "Behçet's disease", based on the findings of the present study.

As is known, the distinguishing features of BS are its recurrent mucocutaneous lesions. Additionally, whether the International Study Group (ISG) or the International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD) criteria are used, the diagnosis / classification of BS requires the presence of certain characteristic mucocutaneous lesions (4 out of 5 and 4 out of 6 criteria are mucocutaneous in origin in the ISG and the ITR-ICBD criteria sets respectively) [10, 43]. Furthermore, while oral aphthous ulcer is a "must" in the ISG criteria, genital aphthous ulcers have more diagnostic value than other criteria in the ITR-ICBD set [10, 43]. As summarized in Table 1, all BS patients in the current study were also sharing mucocutaneous manifestations irrespective of their BS subsets (i.e., MB, OB or VB). We believe that this resemblance of BS patients is of importance, not only from a diagnostic / classification perspective but also from an etiopathogenetic point of view. When the Venn diagram representation of the class comparisons MB *vs* C, OB *vs* C, and VB *vs* C is taken into consideration (Fig 3), the close resemblance of BS patients with respect to their mucocutaneous manifestations is inexplicable with no common DEGs in the intersection "MB *vs* C" ∩ "OB *vs* C" ∩ "VB *vs* C". Therefore, it is crucial to elucidate the molecular pathogenetic mechanisms responsible for the common mucocutaneous manifestations observed in different BS subsets displaying disparate sets of DEGs and distinct disease pathways.

When the FC values and the genomic loci of the DEGs were specifically taken into consideration, negative regulators of inflammation (*CD69*, *CLEC12A*, *CLEC12B*, *TNFAIP3*), neutrophil granule proteins (*LTF*, *OLFM4*, *AZU1*, *MMP8*, *DEFA4*, *CAMP*), antigen processing and presentation proteins (*CTSS*, *ERAP1*), and regulators of immune response (*LGALS2*, *BCL10*, *ITCH*, *CEACAM8*, *CD36*, *IL8*, *CCL4*, *EREG*, *NFKBIZ*, *CCR2*, *CD180*, *KLRC4*, *NFAT5*) were found to be differentially expressed in BS patients with respect to controls (Tables 3, 5 and 6). If the fundamental pathogenetic mechanism of BS is defined as a pro-inflammatory, innate-immune system derived response sustained by acquired immune system responses against environmental and/or self-antigens, it is motivating to note the congruences between the definition and the above-listed gene groups [34].

Table 7. Expression patterns of TNFAIP3 and CD69 in BS subsets and controls.

Gene Symbol	Probe Set ID	Geom mean of intensities in control group	Geom mean of intensities in BS subsets	Fold Change[a]	Parametric p-value
Class comparison MB *vs* C[b]					
Differential expression of *TNFAIP3* was not observed					
CD69	209795_at	1279.38	2169.5	1.70	0.0419338
Class comparison OB *vs* C[c]					
TNFAIP3	202643_s_at	1219.4	428.69	0.35	0.0031889
TNFAIP3	202644_s_at	2742.78	1164.59	0.42	0.0052164
Differential expression of *CD69* was not observed					
Class comparison VB *vs* C[c]					
TNFAIP3	202644_s_at	2742.78	1259.57	0.46	0.0209217
CD69	209795_at	1279.38	316.75	0.25	0.0007591

BS, Behçet's syndrome; *CD69*, cluster of differentiation 69; *TNFAIP3*, tumor necrosis factor, α-induced protein 3.

[a] According to the expression in BS subset with respect to control group.

[b] For the class comparison MB *vs* C, p and FC were ≤0.05 and ≥1.5 respectively.

[c] For the class comparisons OB *vs* C and VB *vs* C, p and FC were ≤0.05 and ≥2.0 respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.t007

Albeit deserving a comprehensive and rigorous discussion which is beyond the limits and the main theme of this manuscript, the negative regulators of inflammation merit special consideration. *CD69*, *CLEC12A*, *CLEC12B*, and *TNFAIP3* are among the well-documented inhibitors of inflammation/immune response [44–48]. Recently, Zhou et al reported a novel autoinflammatory disorder (haploinsufficiency of A20 [HA20]) occurring as a result of loss-of-function mutations in the *TNFAIP3* gene [48]. It is remarkable to note that, phenotypically, HA20 closely resembles BS with the occurrence of recurrent oral ulcers, dermal abscesses, positive pathergy response, and retinal vasculitis [48]. In the present study, we documented that, at the transcriptomic level *TNFAIP3* was downregulated in the OB and VB subsets of BS patients (Table 7 and Fig 5). *CD69*, yet another gene responsible for the regulation of inflammation was also shown to be significantly underexpressed in the VB subset (Table 7 and Fig 5). *CLEC12A* followed a similar trend with underexpression in the VB subset when compared to both the MB and OB subsets. Recently, this finding was communicated as a preliminary result to support a hypothesis about the role *CLEC12A* plays in BS [49]. Taken together, these findings indicate that, in patients with severe forms of BS, negative regulators of inflammation are underexpressed compared to controls and/or patients with milder presentations of the syndrome. Such a downregulation of inhibitors of inflammation may well be responsible for the pro-inflammatory milieu which is characteristic of BS [34]. Conversely stating, in patients with BS, increased expression of negative regulators of inflammation may serve a protective role against severe forms of the syndrome.

This study may be a good example for data mining. By borrowing the gene expression profiling data of Xavier et al, keeping a different perspective, and implementing a novel strategy, our group was able to document significant molecular level discrepancies among BS patient subsets [8, 12]. In their original paper Xavier et al combined gene expression profiling with association studies to elucidate BS's genetic background [8]. Finally, they were able to document that *EREG-AREG* and *NRG1* (members of the epidermal growth factor family), seemed to modulate BS susceptibility through both by direct effects and by gene-gene interactions [8]. Their study strongly emphasized the value of combining "omics" strategies (integration of "omics" data) to reveal the genetic background of complex diseases. Nevertheless, in their

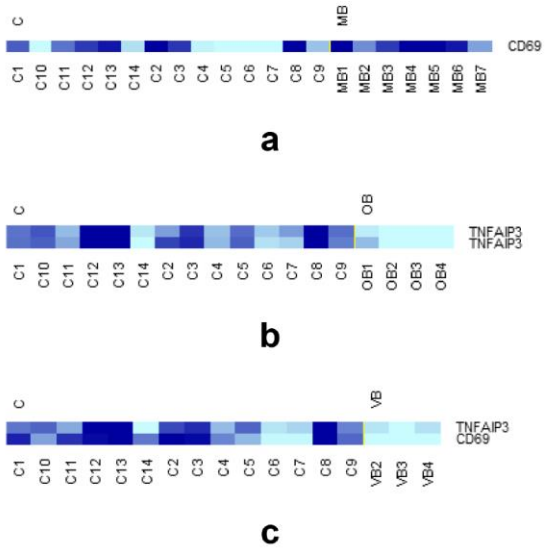


Fig 5. Clustered heatmap representations of *TNFAIP3* and *CD69* expressions in class comparisons MB *vs* C (a), OB *vs* C (b), and VB *vs* C (c). *CD69*, cluster of differentiation 69; *TNFAIP3*, tumor necrosis factor, α-induced protein 3.

doi:10.1371/journal.pone.0149052.g005

study Xavier et al collectively analysed BS patients and did not implement any manifestation based clinical grouping [8]. We believe that their approach has at least two important justifications; the first one being to keep a time honored approach implemented in BS research. With the exception of a limited number of studies which mainly investigate ocular BS in isolation, the current literature harbors research which analyze BS patients in a collective manner regardless of their clinical picture. The second one is due to the "omics" integration design of their study. The genome-wide association studies and the validation patient dataset used by Xavier et al belonged to collective / inclusive sets of BS patients [8]. As such, for their integration study, Xavier et al used the gene expression profiling data of a collective set of BS patients [8].

As is the case with any scientific research, the present study also is not without limitations. The well-known fact about the marked regional variations in the expression of BS necessitates the interpretation of our findings in the context that they belong to a Portuguese population [5, 8]. Because of ethical considerations, continuing therapeutic regimens of BS patients had not been interrupted with potential implications in their expression profiles [8]. Also, in addition to a limited number of patients in each BS subset, BS patients with gastrointestinal, musculoskeletal, or central nervous system involvement were not represented [8]. Therefore, new expression profiling studies enrolling large numbers of treatment-naive BS patients with a wide spectrum of manifestations are clearly needed. The authors also think that in BS, eQTL (expression quantitative trait loci) analysis which simultaneously explore genome-wide expression and genetic variation data will prove worthwhile [50, 51]. The need for validation of the findings in an independent BS cohort may be another issue regarding limitations. Regrettably,

this validation was not possible due to lack of an independent BS cohort's peripheral blood mononuclear cells expression profiling data [9, 52]. Furthermore, the marked regional variations observed in the expression of BS complicate the matter and necessitate that, such a validation data should belong to a Portuguese population.

Conclusions

BS patients display distinct expression profiles and different disease associated pathways in distinct subsets of the disorder. IL-8 production and immune response to microorganisms categories are differentially enriched among BS patient subsets. Future research, especially the studies focusing on a molecular level should take into account the immunogenetic heterogeneity of BS subsets. Based on these discrepancies, the designation as "Behçet's syndrome" should be encouraged.

Negative regulators of inflammation, neutrophil granule proteins, antigen processing and presentation proteins, and regulators of immune response appear to be instrumental in BS immunopathogenesis. Some of these genes/gene products may prove to be specific, effective, and low toxicity therapeutic targets in BS.

Supporting Information

S1 File. Experiment descriptor file.
(XLSX)

S2 File. Gene lists used for *initial verification* clustering.
(XLSX)

S3 File. Gene lists of the differentially expressed genes identified during class comparison analysis.
(XLSX)

S4 File. Gene lists used for clustering.
(XLSX)

S5 File. GO term enrichment analysis results for MB vs C.
(HTML)

S6 File. GO term enrichment analysis results for OB vs C.
(HTML)

S7 File. GO term enrichment analysis results for VB vs C.
(HTML)

Acknowledgments

Analyses were performed using "BRB-ArrayTools" developed by Dr. Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team. For cluster analyses and heatmap representations, "Cluster 3.0" and "TreeView" softwares developed by Michael Eisen and the Stanford group were also used. As the authors, we express our sincere gratitude and appreciation to all the scientists who, for the benefit of Humanity, share their invaluable research data with their colleagues all over the world.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HÖ NA. Performed the experiments: STY TÇ IS. Analyzed the data: AKO ÇŞO AA. Contributed reagents/materials/analysis tools: SSK. Wrote the paper: AKO İE.

References

1. Mat MC, Sevim A, Fresko I, Tüzün Y. Behçet's disease as a systemic disease. Clin Dermatol. 2014; 32:435–442. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.012 PMID: 24767193
2. Behçet H. Uber rezidiverende, aphthose, durch ein Virus verursachte Gescgwure am Mund, am Auge und an den Genitalen. Derm Woch. 1937; 105:1152–1157.
3. Yazici H, Başaran G, Hamuryudan V, Hizli N, Yurdakul S, Mat C, et al. The ten-year mortality in Behçet's syndrome. Br J Rheumatol. 1996; 35:139–141. PMID: 8612025
4. Yazici H, Fresko I, Yurdakul S. Behçet's syndrome: disease manifestations, management, and advances in treatment. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007; 3:148–155. PMID: 17334337
5. Lewis KA, Graham EM, Stanford MR. Systematic review of ethnic variation in the phenotype of Behçet's disease. Scand J Rheumatol. 2007; 36:1–6. PMID: 17454928
6. Lehner T, Batchelor JR. Classification and immunogenetic basis of Behçet's syndrome. In: Lehner T, Barnes CG, editors. Behçet's syndrome: clinical and immunological features. London: Academic; 1979. pp. 14–32.
7. Couzin J. Genomics. Microarray data reproduced, but some concerns remain. Science. 2006; 313:1559.
8. Xavier JM, Krug T, Davatchi F, Shahram F, Fonseca BV, Jesus G, et al. Gene expression profiling and association studies implicate the neuregulin signaling pathway in Behçet's disease susceptibility. J Mol Med. 2013; 91:1013–1023. doi: 10.1007/s00109-013-1022-4 PMID: 23625463
9. Gene Expression Omnibus (GEO) public functional genomics data repository. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/.
10. International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD). Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ICBD). Clin Exp Rheumatol. 2006; 24 (Suppl 42): S14–S15.
11. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME): toward standards for microarray data. Nat Genet. 2001; 29:365–371. PMID: 11726920
12. Blood genomic expression profile for Behçet's disease. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17114.
13. BRB-ArrayTools. An integrated package for the visualization and statistical analysis of Microarray gene expression, copy number, methylation and RNA-Seq data. Available: http://linus.nci.nih.gov/download_BRBArrayTools.html.
14. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003; 4:249–264. PMID: 12925520
15. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:14863–14868. PMID: 9843981
16. Oliveros JC (2007–2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Available: http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html.
17. Zhang B, Kirov SA, Snoddy JR (2005) WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. Available: Nucleic Acids Res 33 (Web Server issue):W741–748. PMID: 15980575
18. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B (2013) WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. Available: Nucleic Acids Res 41 (Web Server issue):W77–83. doi: 10.1093/nar/gkt439 PMID: 23703215
19. Karasneh J, Gul A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behçet's disease. Arthritis Rheum. 2005; 52:1836–1842. PMID: 15934084
20. Meguro A, Inoko H, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Okada E, et al. Genetics of Behçet disease inside and outside the MHC. Ann Rheum Dis. 2009; 69:747–754. doi: 10.1136/ard.2009.108571 PMID: 19684014

21. Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. Nat Genet. 2013; 45:202–207. doi: 10.1038/ng.2520 PMID: 23291587

22. Lehner T, Barnes CG. Criteria for diagnosis and classification of Behçet's syndrome. In: Lehner T, Barnes CG, editors. Behçet's syndrome: clinical and immunological features. London: Academic; 1979. pp. 1–9.

23. Ehrlich GE. Behçet disease and the emergence of thalidomide. Ann Intern Med. 1998; 128:494–495. PMID: 9499334

24. Kapsimali VD, Kanakis MA, Vaiopoulos GA, Kaklamanis PG. Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. Clin Rheumatol. 2010; 29:1211–1216. doi: 10.1007/s10067-010-1491-6 PMID: 20495938

25. Pineton de Chambrun M, Wechsler B, Geri G, Cacoub P, Saadoun D. New insights into the pathogenesis of Behçet's disease. Autoimmun Rev. 2012; 11:687–698. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.026 PMID: 22197900

26. Kiraz S, Ertenli I, Ozturk MA, Haznedaroglu IC, Celik I, Calguneri M. Pathological haemostasis and "prothrombotic state" in Behçet's disease. Thromb Res. 2002; 105:125–133. PMID: 11958802

27. Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G. Disease mechanisms. In: Yazici Y, Yazici H, editors. Behçet's syndrome. New York: Springer; 2010. pp. 243–264.

28. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. A novel leukocyte chemotactic and activating cytokine, interleukin-8 (IL-8). Cancer Treat Res. 1995; 80:261–286. PMID: 8821581

29. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. N Engl J Med. 1999; 341:1284–1291. PMID: 10528040

30. Cho S, Kim J, Cho SB, Zheng Z, Choi MJ, Kim DY, et al. Immunopathogenic characterization of cutaneous inflammation in Behçet's disease. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014; 28:51–57. doi: 10.1111/jdv.12054 PMID: 23216454

31. Maalouf D, Battistella M, Bouaziz JD. Neutrophilic dermatosis: disease mechanism and treatment. Curr Opin Hematol. 2015; 22:23–29. PMID: 25394310

32. Akkurt ZM, Bozkurt M, Uçmak D, Yüksel H, Uçak H, Sula B, et al. Serum cytokine levels in Behçet's disease. J Clin Lab Anal. 2015; 29:317–320. doi: 10.1002/jcla.21772 PMID: 25130392

33. Gür-Toy G, Lenk N, Yalcin B, Aksaray S, Alli N. Serum interleukin-8 as a serologic marker of activity in Behçet's disease. Int J Dermatol. 2005; 44:657–660. PMID: 16101867

34. Direskeneli H. Behçet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. Ann Rheum Dis. 2001; 60:996–1002. PMID: 11602462

35. Kaneko F, Tojo M, Sato M, Isogai E. The role of infectious agents in the pathogenesis of Behçet's disease. In: Zouboulis CC, editor. Adamantiades-Behçet's Disease. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. pp. 181–183.

36. Hatemi G, Yazici H. Behçet's syndrome and micro-organisms. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2011; 25:389–406. doi: 10.1016/j.berh.2011.05.002 PMID: 22100288

37. Galeone M, Colucci R, D'Erme AM, Moretti S, Lotti T. Potential infectious etiology of Behçet's disease. Patholog Res Int. 2012; 2012:595380. doi: 10.1155/2012/595380 PMID: 22254152

38. Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gül A, Onoé K, et al. Immunology and functional genomics of Behçet's disease. Cell Mol Life Sci. 2003; 60:1903–1922. PMID: 14523551

39. Kaneko F, Yanagihori H, Tojo M, Isogai E, Lin SN, Oguma K. Streptococcal antigen in the pathogenesis of Behçet's disease. Arthritis Res Ther. 2003; 5(Suppl 2):13.

40. Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's disease. Eur J Dermatol. 2008; 18:489–498. PMID: 18693149

41. Definition of "disease". Available: http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/disease/.

42. Definition of "syndrome". Available: http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/syndrome.

43. International Study Group for Behcet's Disease.Criteria for diagnosis of Behcet's disease. Lancet. 1990; 335:1078–1080.

44. Lamana A, Sancho D, Cruz-Adalia A, del Hoyo GM, Herrera AM, Feria M, et al. The role of CD69 in acute neutrophil-mediated inflammation. Eur J Immunol. 2006; 36:2632–2638. PMID: 16983725

45. Marshall AS, Willment JA, Lin HH, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. J Biol Chem. 2004; 279:14792–14802. PMID: 14739280

46. Neumann K, Castineiras-Vilarino M, Höckendorf U, Hannesschlager N, Lemeer S, Kupka D, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. Immunity. 2014; 40:389–399. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.015 PMID: 24631154

47. Hoffmann SC, Schellack C, Textor S, Konold S, Schmitz D, Cerwenka A, et al. Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells. J Biol Chem. 2007; 282:22370–22375. PMID: 17562706

48. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in *TNFAIP3* leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. Nat Genet. 2015. doi: 10.1038/ng.3459

49. Oğuz AK, Yılmaz S, Akar N, Özdağ H, Gürler A, Ateş A, et al. C-type lectin domain family 12, member A: A common denominator in Behçet's syndrome and acute gouty arthritis. Med Hypotheses. 2015; 85:186–191. doi: 10.1016/j.mehy.2015.04.032 PMID: 25957656

50. Franke L, Jansen RC. eQTL analysis in humans. Methods Mol Biol. 2009; 573:311–328. doi: 10.1007/978-1-60761-247-6_17 PMID: 19763935

51. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. Nat Rev Genet. 2009; 10:184–194. doi: 10.1038/nrg2537 PMID: 19223927

52. ArrayExpress archive of functional genomics data. Available: https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/.