



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANKİLOZAN SPONDİLİTİN MHC SINIF1 İLİŞKİLİ İMMÜN
PATOGENEZİN İNCELENMESİ**

MERVE GÜLMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ CAN ERZİK
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANKILOZAN SPONDİLİTİN MHC SINIF1 İLİŞKİLİ İMMÜN
PATOGENEZİN İNCELENMESİ**

MERVE GÜLMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ CAN ERZİK
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve GÜLMEZ

İmza

TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda aldığım yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden sıkça yararlandığım, her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Can Erzik'e,

Değerli bilgilerinden istifade ettiğim sayın hocalarım Prof. Dr. Mustafa Akkiprik, Prof. Dr. İlter Güney ve Prof. Dr. Fatih Eren'e,

Tezimin planlanması, verileri toplanma ve değerlendirme aşamalarında yardımını esirgemeyen Şeyma Çolakoğlu Özkaya'ya,

Tez çalışmam sürecinde yardımları ve gösterdikleri anlayışlarından ötürü değerli hocalarım Doç. Dr. Kanay Yararbaş ve Op. Dr. Deniz Dehni'ye,

Manevi destekleri ve dostluklarından ötürü çok sevdiğim Sapiens Genetik ailesine,

Tez çalışmam sırasında manevi desteklerini benden esirgemeyen Nazmi Karataş ve Fatma Karataş'a,

Yetişmemde ve bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama, anneanneme ve kız kardeşime,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Spondiloartropatiler	5
4.2. Ankilozan Spondilit	7
4.2.1. Tanım ve epidemiyoloji	7
4.2.2. Değerlendirme ve izlem	7
4.2.3. Etiyolojisi	8
4.2.3.1. Genetik faktörler.....	8
4.2.3.1.1. HLA-B27.....	8
4.2.3.1.2. ERAP1 ve Ankilozan spondilit ile ilişkilendirilmesi	10
4.2.4. Patogenezi	11
4.2.4.1. Artritogenik peptit hipotezi	11
4.2.4.2. Ağır zincir homodimerlerinin oluşumu hipotezi	12
4.2.4.3. Hatalı katlanma hipotezi.....	13
4.2.4.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR).....	15
4.2.4.3.2. UPR ve sitokin düzenlenmesi	16
5. GEREÇ VE YÖNTEM	17
5.1. Çalışma Grubu	17
5.2. Kullanılan Aletler	17
5.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	18
5.4. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	18
5.5. Kullanılan Primerler	19
5.6. Kullanılan Çözeltiler.....	19
5.7. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PBMC) ve Plazma İzolasyonu.....	19
5.8. RNA İzolasyonu	20
5.9. RNA'dan cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizi.....	20
5.10. Eliza ile Plazmadaki Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	22
5.11. Akış Sitometrisi ile Hatalı Katlanan Proteinlerin Tespiti	23
6. BULGULAR	25
6.1. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	26
6.2. Eliza Sonuçları	29
6.3. Akış Sitometrisi Sonuçları	33

7. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
8. KAYNAKLAR.....	38



KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
AS	: Ankilozan Spondilit
ASAS	: Assessment in Spondyloarthritis International Society
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
BASDAI	: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	: Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
BASRI	: Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index
BiP	: Binding Immunoglobulin Protein
Cdna	: Tamamlayıcı DNA
CHOP	: C/EBP Homologous Protein
CRP	: C reaktif protein
EA	: Enteropatik Artrit
EBH	: Enflamatuvar Barsak Hastalığı
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER Aracılı Yıkım Yolağı
ERAP1	: Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz 1
ESR	: Eritrosit Sedimentasyon Oranı
ESSG	: European Spondyloarthtopathy Study Group
EtOH	: Etil Alkol
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HLA-B27	: İnsan Lökosit Antijen B-27
IL-17	: İnterlökin 17
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL23R	: İnterlökin 23 Reseptör
IL-6	: İnterlökin 6
IRE1	: İnositol Gerektiren Enzim 1
JspA	: Juvenil Spondiloartrit
MHC	: Majör Doku Uygunluk Kompleksi
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Haberci RNA
PERK	: PKR-benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
PsA	: Psoriatik Artrit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ReA	: Reaktif Artrit

RF : Romatoid Faktör
SpA : Spondiloartropati
TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa
UPR : Katlanmamış protein yanıtı
XBP1 : X-kutu Bağlama Proteini 1



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Major histokompatibilite kompleksi	9
Şekil 2. HLA sınıf 1 molekülü	10
Şekil 3. Ankilozan spondilitin patogenezi.....	11
Şekil 4. ER proteinlerinin yanlış katlanması sonuçları	14
Şekil 5. AS hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında CRP düzeyinin dağılımı.....	26
Şekil 6. IRE1, PERK, ATF6 ve XBP1 ekspresyon seviyeleri	26
Şekil 7. Hastaların ve sağlıklı bireylerin XBP1 erime sıcaklığı eğrileri	27
Şekil 8. Hastaların ve sağlıklı bireylerin XBP1 erime pikleri.....	27
Şekil 9. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin IRE1 amplifikasyon eğrileri	28
Şekil 10. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin ATF6 amplifikasyon eğrileri.....	28
Şekil 11. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin XBP1 amplifikasyon eğrileri.....	29
Şekil 12. IL-17 standartlarının konsantrasyon değerleri (pg/mL).....	30
Şekil 13. IL-6 standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L).....	31
Şekil 14. TNF- α standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L).....	32
Şekil 15. IL-1 β standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L).....	33
Şekil 16. IP164 kodlu HLA-B27 pozitif hastaya ait akış sitometrisi grafiği	34
Şekil 17. IP185 kodlu HLA-B27 negatif hastaya ait akış sitometrisi grafiği.....	34
Şekil 18. K45 kodlu hastaya ait akış sitometrisi grafiği.....	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. ESSG kriterleri (European Spondyloarthtopathy Study Group- Avrupa spondiloartropati çalışma grubu)	5
Tablo 2. Spondiloartritler için amor sınıflama kriterleri.....	6
Tablo 3. Spondiloartritler (SpA) için ASAS sınıflandırma kriterleri	6
Tablo 4. Ankilozan spondilit için modifiye New York kriterleri	7
Tablo 5. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı	21
Tablo 6. cDNA protokolü	21
Tablo 7. RT-PCR reaksiyon içeriği	22
Tablo 8. PZR döngü koşulları.....	22
Tablo 9. Eliza standart miktarları.....	22
Tablo 10. Akım sitometrisinde kullanılan antikorlar ve antikor işaretleri.....	24
Tablo 11. Hastalık aktivite ölçümleri ile hasta grupları arasındaki karşılaştırma.....	25
Tablo 12. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar IL-17'nin konsantrasyon değerleri.....	30
Tablo 13. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar IL-6 konsantrasyon değerleri	31
Tablo 14. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar TNF- α konsantrasyon değerleri (ng/L).....	32
Tablo 15. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar IL-1 β konsantrasyon değerleri (ng/L).....	33
Tablo 16. Hasta ve sağlıklı kontrollerde tespit edilen lenfosit, T lenfosit, HC10 antikorlarının yüzdeleri	34

1. ÖZET

Tezin Başlığı: Ankilozan Spondilitin MHC Sınıfı İlişkili İmmün Patogenezin İncelenmesi

Öğrenci Adı Soyadı: Merve GÜLMEZ

Danışman Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK

Programın Adı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

Amaç: Bu çalışmada hastalığın immün mekanizmalarının aydınlatılması için HLA-B27(-) ve HLA-B27(+) hastalarda meydana gelen ankilozan spondilit (AS) patogenezinde hatalı katlanmanın yeri araştırıldı ve sağlıklı kontrollerle farklı parametreler ile karşılaştırılarak hastalık oluşumu ve gelişimi ile ilişkilendirilmesi hedeflendi.

Gereç ve yöntem: İç Hastalıkları ABD Romatoloji BD polikliniğine başvuran uluslararası kriterlere göre AS tanısı kesinleşmiş 30 AS hastası ve eş sayıda sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edildi. Hasta ve sağlıklı kontrollerden periferik kan örnekleri toplandı. Akış sitometrisi yöntemiyle mononükleer hücrelerinde hatalı katlanma tayini yapıldı, kantitatif PZR ile UPR genleri *IRE1*, *PERK*, *ATF6* ve *XBPI* ekspresyon düzeyleri ve ELISA ile proinflamatuvar IL-17, IL-1 β , IL-6 ve TNF α düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: *XBPI*, *IRE1* ve *PERK* gen ekspresyon düzeylerinin hastalar ve sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmezken ($p>0.05$), *ATF6* gen ekspresyon değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.001$). Hastaların serumlarındaki IL-17, IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0.05$); fakat AS hastalarının serumlarındaki TNF- α düzeyleri anlamlı bulundu. AS hastalarında HC10 antikoru gözlenmiş olup, hatalı katlanan proteinlerin miktarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış gözlemlendi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, HLA-B27'nin yanlış katlanması, endoplazmik retikulum (ER) stresine ve katlanmamış protein yanıtının (UPR) aktivasyonuna yol açabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bu çalışmanın daha geniş bir hasta popülasyonunu kapsaması hastalığın gelişimi, seyri ve tedavi yanıtları hakkında daha kapsamlı bilgiler sunabilir.

Anahtar Kelimeler: Ankilozan spondilit, hatalı protein katlanması, katlanmamış protein yanıtı (UPR)

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of MHC Class I-Associated Immune Pathogenesis in Ankylosing Spondylitis

Student Name, Surname: Merve GÜLMEZ

Supervisor Name: Asst. Prof. Can ERZİK

Program Name : Medical Biology and Genetics Master's Program

Objective: In this study, we aimed to investigate the role of misfolding in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (AS) in both HLA-B27 (-) and HLA-B27 (+) patients to elucidate the immune mechanisms of the disease. The goal was to compare various parameters with healthy controls, aiming to associate them with the development and progression of the disease.

Material and methods: 30 patients with confirmed Ankylosing Spondylitis (AS) diagnosis according to international criteria, and 30 healthy controls. Peripheral blood samples were collected from both patients and healthy controls. Misfolding determination was performed on mononuclear cells using the flow cytometry method. The expression levels of Unfolded Protein Response (UPR) genes were quantified using quantitative PCR, and proinflammatory cytokine levels were measured using ELISA.

Results: While no statistically significant increase was observed in the expression levels of *XBPI1*, *IRE1*, and *PERK* genes in patients compared to healthy controls ($p>0.05$), the difference in *ATF6* gene expression values was found to be statistically significant ($P<0.001$). There was no statistically significant change in the levels of IL-17, IL-1 β , and IL-6 in the patients' sera ($p>0.05$); however, TNF- α levels in the sera of AS patients were found to be significant. The presence of the HC10 antibody was observed in AS patients, and a significant increase in the amount of misfolded proteins was observed compared to healthy controls.

Conclusion: The obtained results suggest that the misfolding of HLA-B27 can lead to endoplasmic reticulum (ER) stress and activation of the unfolded protein response (UPR). The inclusion of a broader patient population in this study could provide more comprehensive insights into the development, progression, and treatment responses of the disease.

Keywords: Ankylosing Spondylitis, misfolded protein folding, unfolded protein response (UPR)

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Spondiloartropatiler (SpAs), öncelikli olarak sakroiliak eklemleri ve omurgayı tutan, ortak özelliklere sahip ankilozan spondilit (AS), reaktif artrit (ReA), enflamatuvar barsak hastalığı (EBH), juvenil spondiloartropati ve psoriyatik artrit (PsA)'den oluşan kronik enflamatuvar hastalık grubudur (Zhu, W. ve ark., 2019).

Ankilozan Spondilit (AS), spondiloartropati hastalık grubunda yer alan kronik inflamatuvar otoimmün eklem hastalıklarından biridir. Enflamatuvar sırt ağrısı, asimetrik periferik oligoartrit, entezit, akut ön üveit, sedef hastalığı ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi spesifik organ tutulumu ile karakterizedir (Braun & Sieper, 2007; Zhu, W. ve ark., 2019).

Major Histocompatibility Complex (MHC) Sınıf I molekülü olan insan lökosit antijeni (HLA)-B27 hastalıkla ilişkilendirilen ilk gendir ve AS olgularının %90'ı HLA-B27 pozitifdir; fakat B27 pozitif bireylerin yalnızca %1-%5'inde AS görülür (S. van der Linden ve ark., 1983; D. Prakash ve ark., 2014; M. Navallas ve ark., 2013). Dolayısıyla bu genin patojenik rolü tam olarak bilinmemektedir ve hastalığın oluşumunda çevresel ve genetik faktörlerin birlikte katkı sağladığı düşünülmektedir (FW., Tsui ve ark., 2014).

AS ile ilişkilendirilen HLA-B27 molekülünde immün yanıtın nasıl oluştuğu net olarak bilinmediği için çeşitli mekanizmalara bağlanarak artritojenik peptit teorisi, katlanmamış protein yanıtı tepkisi teorisi ve serbest ağır zincir teorisi ortaya atılmıştır (LS., Tam ve ark., 2010). Artritojenik peptit teorisi, oluşan sitotoksik T hücre yanıtının ilerleyen zamanlarda B27 tarafından T hücrelerine sunulan artritojenik self-peptitlere yönelmesinden kaynaklı AS patogenezi olduğunu savunmaktadır (R.B., Schittenhelm ve ark., 2015). HLA-B27 homodimerlerin hücre yüzey teorisine göre; β 2-mikroglobulin içermeden katlanan dimerik yapıdaki HLA-B27, disülfid bağları engellendiği için dimer yapıdadır ve bu farklılaşmış formun T hücreleri tarafından özgül olarak tanınmasıyla enflamasyona yol açabileceğini savunmaktadır (R.A., Colbert ve ark., 2010). Son teori ise protein katlanma bozukluğu ve buna bağlı endoplazmik retikulum (ER) stresi oluşması esasına dayanır. Bu teoriye göre yavaş veya hatalı katlanmanın sebebi 67. Pozisyondaki sisteinlerin köprü oluşturmasından kaynaklıdır ve bu durum endoplazmik retikulum stresine yol açarak hücre içi inflamatuvar yolları aktive etmektedir (M., Yazar ve G.S., Kaplan, 2017). ER, hatalı veya yavaş katlanan proteinlerin yol açtığı stresi algılar ve stres seviyesini fizyolojik konumuna getirmek için katlanmamış protein yanıtı (UPR) başlatır. ATF6, IRE1 ve PERK transmembran proteinleri aktive edilir, bu ER yerleşimli proteinler aracılığıyla stres sinyalleri farklı transkripsiyon faktörlerinin yapımını, moleküler şaperonların indüksiyonunu, protein degradasyonunun artışı ve apoptoz

oluşumunu uyarır. ER stresi, NF-κB yolaklarının uyarılmasına neden olur ve TNFα, IL-1β, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin salınımları uyarılarak inflamatuvar yanıt oluşmaktadır (S., Çetinkaya ve H.G., Dursun, 2016).

Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada hastalığın immün mekanizmalarının aydınlatılması için MÜ Hastanesi Romatoloji Polikliniği'nde izlenen 30 AS hastası ve otoimmün/otoinflamatuvar hastalığı olmayan 30 sağlıklı bireyden periferik kan örnekleri toplanacaktır. Akış sitometri yöntemiyle periferik kan mononükleer hücrelerinde hatalı katlanma tayini yapılacak, kantitatif PZR ile UPR genleri *IRE1*, *PERK*, *ATF6* ve *XBPI* ekspresyon düzeyleri ve ELISA ile proinflamatuvar IL-17, IL-1β, IL-6 ve TNFα düzeyleri ölçülecektir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Spondiloartropatiler

Spondiloartropatiler (SpA), çoğunlukla sakroiliak eklemler ve omurgayı, bununla birlikte diğer organları da tutabilen genetik, epidemiyolojik, klinik ve radyolojik ortak özellikleri olan romatolojik hastalıklara verilen genel addır. Spondiloartritlerde tipik bir özellik yoktur, birden fazla semptomla karakterizedir. Ortak klinik özellikleri arasında sırt, bacak ve kollarda ağrı, sertlik, genellikle asimetrik periferik artrit, entezit, üveit ile birlikte eklem bozuklukları, sedef hastalığı, CRP’de artış, doku uygunluk antijeni olan HLA-B27 ile ilişki ve romatoid faktörün (RF) olmaması sayılabilir.

Spondiloartropatilerin klasik sınıflandırmasında, Ankilozan spondilit (AS), reaktif artrit (ReA), psoriatik artrit (PsA), ülseratif kolit, Crohn hastalığı, inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) gibi hastalıkları içine alan enteropatik artrit (EA) ve juvenil spondiloartrit (JspA) yer alır. Ayrıca, SpA’ların spektrumunu sınıflandırmak için Avrupa Spondiloartropati Çalışma Grubu (ESSG) ve Amor kriterleri geliştirilmiştir. Bu kriterlerin uygulanması kolay olduğu için epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmasına rağmen duyarlılık ve özgüllük açısından yeterli olmadığı gösterilmiştir (M., Rudwaleit., 2011) (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1. ESSG kriterleri (European Spondyloarthopathy Study Group- Avrupa spondiloartropati çalışma grubu) (Dougados ve ark., 1991)

İnflamatuvar Bel Ağrısı	veya + Aşağıdakilerden biri	Sinovit (Asimetrik, ağırlıklı olarak alt ekstremitede)
Entezit Pozitif Aile Öyküsü Psöriazis Crohn hastalığı / Ülseratif Kolit Artritten önceki 1 ay içinde üretrit- servisit- diyare Gluteal bölgede ağrı sakroileit		

Son yıllarda erken tanının iyileştirilmesi ve standardize edilmesi için Uluslararası Spondiloartrit Değerlendirme Derneği (ASAS) kriterleri oluşturulmuştur. ASAS kriterlerine göre SpA’lar aksiyal spondiloartrit ve periferik spondiloartrit olarak gruplanmaktadır (Rudwaleit M ve ark., 2011) (Tablo 3).

Tablo 2. Spondiloartritler için amor sınıflama kriterleri (B., Amor ve ark., 1990)

Klinik Semptomlar / Öykü	Skor
Gece ağrısı (omurga) veya sabah sertliği	1
Asimetrik oligoartrit	2
Gluteal ağrısı veya gezici gluteal ağrı	1
Sosis parmak (daktilit)	2
Entezit	2
Üveit	2
Artritin başlangıcından önceki bir ay içinde üretrit/servisit	1
Artritin başlangıcından önceki bir ay içinde diyare	1
Psöriyazis, balanit veya inflamatuvar bağırsak hastalığı	2
X-ray	
sakroileit (evre 2 çift taraflı veya evre 3 tek taraflı)	3
Genetik Zemin	
HLA-B27 pozitif veya AS.ReA, üveit psöriyazis veya inflamatuvar bağırsak hastalığı için pozitif aile öyküsü	2
NSAİİ'a iyi yanıt	
NSAİİ'a 48 saat içerisinde iyi yanıt, veya NSAİİ kesildiğinde 48 saat içerisinde relaps	2

* En az 6 puan gereklidir.

Tablo 3. Spondiloartritler (SpA) için ASAS sınıflandırma kriterleri (Rudwaleit M ve ark., 2011)

Bel ağrısının süresi ≥ 3 ay olan ve başlangıç yaşı < 45 yaş olan hastalarda			SADECE Periferik semptomları olan hastalarda
Görüntülemelerde sakroilit + ≥ 1 SpA bulgusu	veya	HLA-B27 + ≥ 2 diğer SpA bulguları	Artrit veya entezit veya daktilit +
SpA bulguları İnflamatuvar bel ağrısı artrit entezit üveit daktilit psöriyazis Crohn/Kolit NSAİİ iyi yanıt SpA için aile öyküsü HLA-B27 artmış CRP			≥ 1 SpA bulgusu üveit psöriyazis Crohn/Kolit öncül enfeksiyon HLA-B27 Görüntülemelerde sakroilit veya ≥ 2 diğer SpA bulguları artrit entezit daktilit inflamatuvar bel ağrısı SpA için aile öyküsü

4.2. Ankilozan Spondilit

4.2.1. Tanım ve epidemiyoloji

Ankilozan spondilit (AS), SpA grubunda yaygın görülen kronik inflamatuvar ve otoimmün eklem hastalıklarından biridir. İnflamatuvar sırt ağrısı, ağırlıklı olarak alt ekstremitelerde asimetrik periferik oligoartrit, entezit, anterior üveit, sedef hastalığı ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi spesifik organ tutulumunu içeren klinik özelliklere sahiptir. AS, omurgadaki eklemlerin iltihabı ve sakroileit ile karakterizedir. Etkilenen eklemlerde düzensiz erozyon oluşur. Bu lezyonlar omurgada meydana geldiğinde, hastalığın ileri evrelerinde “bambu omurga” olarak adlandırılan omurların kaynaşarak kemik oluşturması gözlenebilmektedir (J., Sieper ve ark., 2002).

AS, genellikle genç yaşlarda ortaya çıkan ve erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenen bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık %80’inde ilk semptomlar 30 yaşın altındayken, yalnızca %5’inden azında 45 yaşında sonra ortaya çıkmaktadır (E., Feldtkeller ve ark., 2007). AS’nin genel popülasyonda görülme sıklığı %0.1 ile %1.4 arasındadır. Yapılan çalışmalara göre, AS insidansı yılda 100.000 kişide 0,5 ile 14 arasında değişmektedir (N., Akkoç ve M.A., Khan, 2005, G., Bakland ve ark., 2005). AS teşhisi için belirlenen New York kriterleri referans alınmaktadır (S. van der Linden ve ark., 1984.) (Tablo 4).

Tablo 4. Ankilozan spondilit için modifiye New York kriterleri (S., van der Linden ve ark., 1984)

Klinik Kriterler Üç aydan daha fazla süredir egzersizle düzelen ancak istirahatle dinmeyen bel ağrısı ve sertlik. Lomber omurga hareketlerinin hem sagittal hem de frontal planlarda kısıtlanması. Yaş ve cinsiyete uygun normal değerlere göre göğüs ekspansiyonunda daralma.
Radyolojik Kriterler Sakroileit evre ≥ 2 çift taraflı veya evre 3-4 tek taraflı

* Radyolojik kriterler eşliğinde en az 1 klinik kriter varlığında **kesin ankilozan spondilit**.

4.2.2. Değerlendirme ve izlem

Ankilozan spondilitin aktivitesini, fonksiyonel durumunu ve hastanın tedaviye verdiği yanıtı izlemek amacıyla çeşitli indeksler geliştirilmiştir. Hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan indeks Bath AS Hastalık Aktivite İndeksi (BASDAI)’dir (S., Garret ve ark., 1994). Hastaların fonksiyonel durumunu belirlemek içinse Bath AS Fonksiyonel İndeksi (BASFI) ve Bath AS Metroloji İndeksi (BASMI) geliştirilmiştir (T.R., Jenkinson ve ark., 1994).

AS’de hastalığın değerlendirilmesi ve aktivitesinin belirlenmesi önemlidir; fakat klinik bulgular, C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) gibi inflamasyon

belirteçleri değerlendirme için yeterli değildir. BASDAI, hastalar arasındaki değerlendirmelerin bir standarda bağlanması için kolaylıkla uygulanabilen bir ölçümdür. Hastaların son bir haftadaki aksiyel ve periferik eklemlerdeki ağrı yoğunluğunun, yorgunluk ve sabah tutukluğu şiddetinin değerlendirmesi için 6 sorudan oluşan güvenilirliği yüksek bir ölçümdür.

AS hastalarının fonksiyonel durumunu belirlemek için geliştirilen BASFI, hastaların son bir haftadaki fonksiyonlarını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Hastalık aktivitesi ve hasarı ile ilişkili 10 sorudan oluşur. BASMI, spinal mobilite için, Bath AS Radyoloji İndeksi (BASRI) ise vertebra ve kalçanın radyolojik bulgularını değerlendirmek için kullanılmaktadır.

4.2.3. Etiyolojisi

Otoimmün bir hastalık olan AS'nin etiyolojisi günümüzde halen net olarak bilinmemektedir; fakat yapılan çalışmalar AS'ye yatkınlıkta genetik ve çevresel faktörlerin etkisi olduğunu göstermiştir.

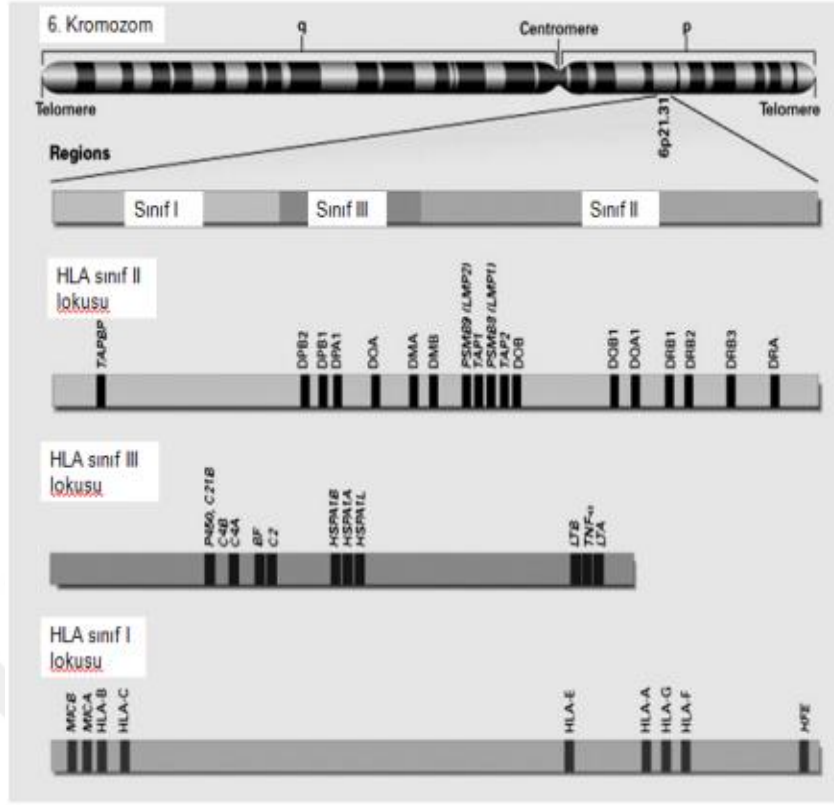
4.2.3.1. Genetik faktörler

AS'nin oluşumunda genetik faktörlerin önemi 1961'den beri yapılan aile içi çalışmalarla doğrulanmıştır (J., Blecourt ve ark., 1961). İkizlerde yapılan çalışmalara göre, tek yumurta ikizlerinde konkordans %63 iken, çift yumurta ikizlerinde %24 olarak belirlenmiştir. Bu da hastalıkta genetik faktörlerin önemli etkisi olduğunu göstermektedir (J.D., Reveille, 2011).

4.2.3.1.1. HLA-B27

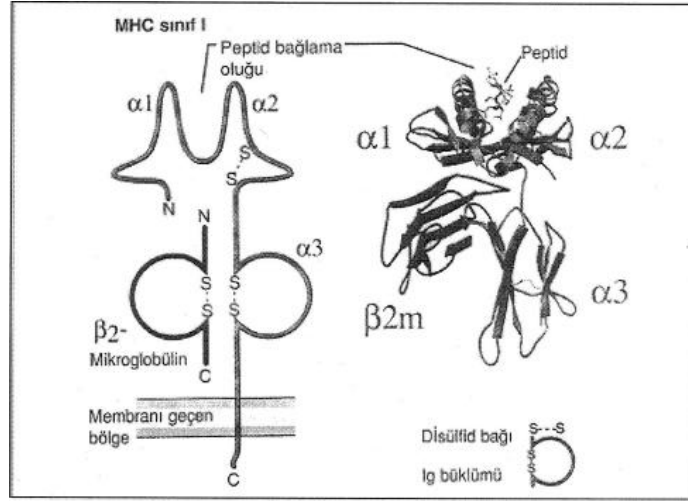
Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) Sınıf I alleli olan HLA-B27 en önemli genetik faktör olarak hastalıkla ilişkilendirilmiştir (D.A., Brewerton ve ark., 1973). HLA-B27 hastalıkla ilişkilendirilen ilk gendir ve AS olgularının %80'i HLA-B27 pozitifdir. Fakat B27 pozitif bireylerin çok azında AS görülür. Bu oran, bireyin birinci derece yakınında AS varsa %15-21'e çıkmaktadır (J.D., Reveille, 2011). Bununla birlikte, HLA-B27 pozitif hastalarda, HLA-B27 negatif hastalara göre ilk semptomlar daha erken gözlenmekte ve daha yüksek akut ön üveit prevalansı göstermektedir (E., Feldtkeller ve ark., 2003).

HLA-B27 yüksek polimorfizme sahiptir, şimdiye kadar 170'ten fazla alt tip tanımlanmıştır (F., Paladini ve ark., 2019). AS'de gözlenen en yaygın alt tipler Kafkas popülasyonları için HLA-B2705, Çin popülasyonları için HLA-B2704 ve Akdeniz popülasyonları için HLA-B2702 olarak bildirilmiştir (M.A., Khan, 2013). Buna rağmen, HLA-B2706 ve HLA-B2709 alt tiplerinin AS ile bir ilişkisine rastlanmamıştır (J.D., Taurog, 2007 ve M., D'Amato ve ark., 1995).



Şekil 1. Major histokompatibilite kompleksi (Ö.G., Öztürk, 2011)

HLA-B27, 6. kromozomun kısa kolunda bulunan Major Histocompatibility Complex (MHC) gen bölgesindeki bir sınıf I proteindir (S.Y., Choo, 2007). MHC sınıf I molekülleri polimorfik ağır zincir (HC), β 2-mikroglobulin (β 2m) ve amino ucunda 8-11 aminoasit uzunluğunda sadece uyumlu aminoasit dizilerini içeren antijenlerin bağlanabildiği bir peptit bağlama bölgesi içerir (J.P., Goodridge ve ark., 2010) (Şekil 1). Hücre içinde sentezlenen proteinler proteasom tarafından parçalandıktan sonra, elde edilen peptitler, endoplazmik retikulumda (ER) MHC sınıf I molekülleri ile birleşir. Bu bağlanma α zincirinin oluşunda gerçekleşir. β 2m ile birleşen MHC sınıf I-peptit kompleksi, hücre yüzeyine taşınır. β 2m'nin stabilitesi, α zincirinin oluk yapısını korumasına yardımcı olur. Hücre yüzeyinde bulunan MHC sınıf I-peptit kompleksi, CD8⁺ T hücreleri tarafından tanınır. CD8⁺ T hücreleri, bu kompleksi tanıdıklarında etkinleşir ve enfekte hücreleri tanıyarak hedef hücreleri doğrudan öldürmeye (sitotoksiste) veya diğer bağışıklık hücreleriyle iş birliği yaparak hedef hücreleri etkisiz hale getirmeye yönlendirir. HLA-B27 transgenik sıçanlarda yapılan çalışmalar, β 2m içermeyen sıçanlarda spontan inflamatuvar artrit geliştiğini göstermiştir (S.S., Weinreich ve ark., 1997).



Şekil 2. HLA sınıf 1 molekülü (E. Diyarbakır, 2009)

AS'nin, MHC bölgesinde yer alan varyantlar ve HLA alelleri ile güçlü bir ilişkisi vardır; fakat genetik faktör olarak ERAP1 ve IL23 gibi varyantların hastalığa yakınlıkla ilgili olduğu yapılan ilk büyük ölçekli SNP çalışmasında belirlenmiştir. Sonrasında yapılan birçok genom çapında ilişkilendirme çalışmasında (GWAS) MHC dışı bölgelerde en az 36 genetik varyant AS ile ilişkilendirilmiştir (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2011). HLA-B27, AS'nin kalıtsallığının ~%20'sine katkıda bulunurken, bugüne kadar tanımlanmış olan MHC dışı lokusların katkısı ~%10 olarak belirlenmiştir (A., Hanson ve ark., 2017).

4.2.3.1.2. ERAP1 ve Ankilozan spondilit ile ilişkilendirilmesi

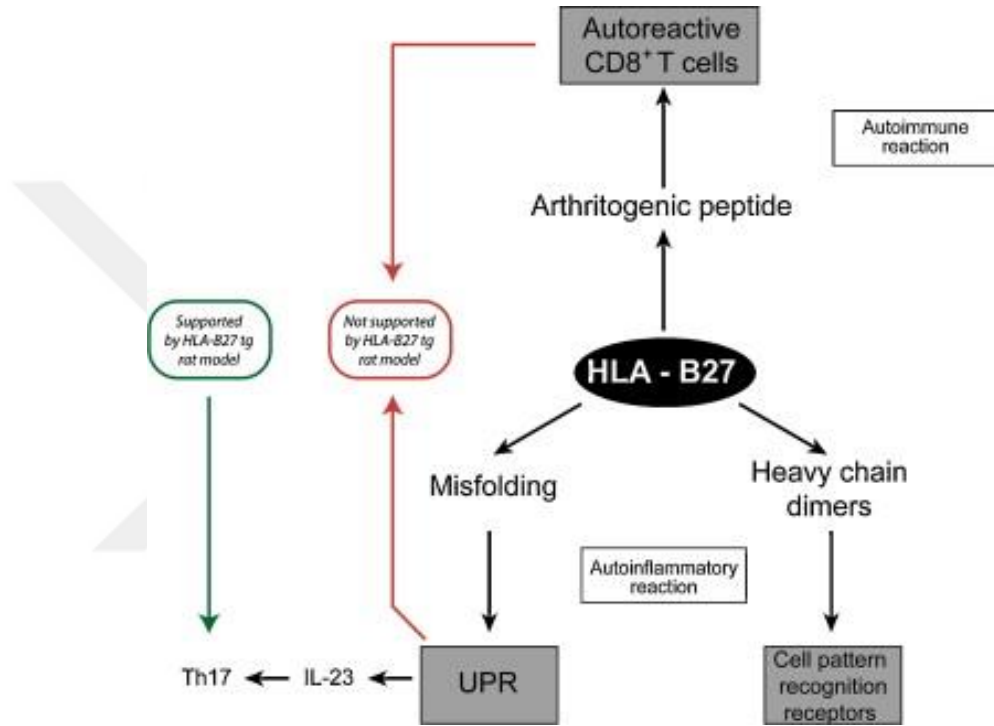
ERAP1 (Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz 1), endoplazmik retikulumda bulunan hücresel proteinlerin amino uçlarından keserek, HLA sınıf 1 alellerinin sunabileceği uygun uzunluktaki peptit parçalarını oluşturan çok işlevli bir amino-peptidazdır. Bu enzim, endoplazmik retikulumda peptite parçalarının kesilmesi ve işlenmesiyle ilgili bir işlev gösterir. Bu işlev, immün sistemdeki T hücreleri tarafından tanınması ve tepki verilmesi için önemlidir.

ERAP1 geni de bazı araştırmalarda AS ile ilişkilendirilmiş ve bu genin AS patogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

ERAP1 geni, antijen sunumunda rol oynayan peptite parçalarının kesilmesi ve düzenlenmesi ile ilgili olduğundan, HLA-B27 gibi belirli HLA alelleri ile bu genin varyantları, antijen sunum sürecinde değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, bağışıklık sistemine sunulan peptite parçalarının yapısında farklılıklara yol açabilir ve bağışıklık sistemi tepkilerini etkileyebilir. Bazı araştırmalar, *ERAP1* geni varyantlarının veya polimorfizmlerinin, HLA-B27 ile AS riskini etkileyebileceğini öne sürmektedir. Örneğin, bazı ERAP1 varyantları, peptite parçalarının işlenmesinde değişikliklere neden olabilir ve bu da bağışıklık sistemini etkileyebilir, AS riskini artırabilir veya azaltabilir.

4.2.4. Patogenezi

HLA-B27 geni, ankilozan spondilit (AS) gibi spondiloartropatilerle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Ancak, HLA-B27'nin AS'nin patogenezi üzerindeki tam rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. HLA-B27 ile ilişkilendirilen ankilozan spondilitin patogenezi için artrojenik peptit hipotezi, ağır zincir homodimerlerinin oluşumu hipotezi ve hatalı katlanma hipotezi ortaya atılmıştır. Bu bölümde HLA-B27 ile ilişkilendirilen ankilozan spondilitin patogenezi açıklayan teoriler ve genetik çalışmalarda ortak olarak görülen aminopeptidaz ERAP1'in rolüne değinilecektir.



Şekil 3. Ankilozan spondilitin patogenezi (Kirsten Braem, Rik J. Lories, 2012)

4.2.4.1. Artritojenik peptit hipotezi

Artrojenik peptit teorisi, AS'nin patofizyolojisinde rol oynayan bir mekanizmayı tanımlar. Bu teoriye göre, eklem kıkırdağı ve dokularında meydana gelen hasar veya stres, vücutta belirli artritojenik peptitlerin salınmasına neden olur. Bu peptitler inflamatuvar özelliklere sahiptir ve bağışıklık sistemini harekete geçirerek iltihaplanmaya yol açabilirler. Bu iltihaplanma sürecinde, çeşitli immün hücreleri (örneğin, makrofajlar veya lenfositler) etkilenen bölgeye yönlendirilir ve bu peptitler, immünolojik reaksiyonlara ve iltihaplanmaya sebep olarak, ankilozan spondilitin semptomlarını ve hastalığın ilerlemesini tetikleyebilir. Bununla birlikte, artritojenik peptitlerin kesin olarak nasıl salındığı veya hangi süreçlerin bu salınımı tetiklediği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Ancak, bu teori hastalığın tam olarak nedenini açıklayamaz ve AS'nin gelişimindeki diğer faktörler (genetik yatkınlık, bağışıklık sistemi bozuklukları, çevresel faktörler vb.) göz ardı edilemez. Ankilozan spondilitin karmaşık bir hastalık olduğu ve birkaç mekanizmanın bir araya gelerek hastalığın ortaya çıkışına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, artritogenik peptit teorisi sadece hastalığın bir yönünü açıklamaya yönelik bir hipotezdir ve hastalığın tam mekanizması hala araştırma konusudur (A., Sharip ve J., Kunz, 2020).

4.2.4.2. Ağır zincir homodimerlerinin oluşumu hipotezi

Ankilozan spondilit (AS) ile ilgili yapılan araştırmalardan bir diğeri, ağır zincir homodimerlerinin oluşumu hipotezidir. Bu hipotez, AS'nin patogenezindeki mekanizmalardan birini açıklamaya çalışır ve *HLA-B27* genine sahip bireylerdeki ağır zincir moleküllerinin katlanmasının ve birleşmesinin hastalık gelişiminde rol oynayabileceğini öne sürer.

Ağır zincir homodimerlerinin oluşumu hipotezi, bu genin ürettiği HLA-B27 proteininin nasıl katlanıp birleştiğine odaklanır. Bu hipoteze göre, HLA-B27 molekülleri içinde yer alan 67. pozisyondaki sistein amino asidi, oksitlenerek disülfid bağları oluşturabilir. Bu disülfid bağları, molekülün yapısını stabilize edebilir ve homodimerlerin oluşumunu teşvik edebilir.

HLA-B27 proteininin farklı katlanmış formu, özellikle β 2-mikroglobulin ile birleşmeyen dimerik bir yapıda oluşabilir. Bu durumda, disülfid bağlarının engellenmesiyle HLA-B27 molekülleri yanlış bir şekilde birleşebilir, bu da T hücreleri tarafından özgül olarak tanınabilir ve bağışıklık sisteminin reaksiyonunu tetikleyebilir. Bu farklı katlanmış HLA-B27 yapıları veya dimerik yapılar, bağışıklık sistemine yanıt vermesine neden olarak inflamasyonu artırabilir. Bağışıklık sistemi, bu farklı yapıları yabancı veya tehlikeli olarak algılayabilir ve otoimmün yanıtın başlamasına neden olabilir. Bu durumda, bağışıklık sistemi vücut dokularına saldırabilir ve inflamasyon, doku hasarı ve hastalık semptomlarına yol açabilir.

HLA-B27 homodimerlerinin ER'de birikmesi, ER stres yanıt yollarını aktive edebilir ve bu da proinflamatuvar sitokinlerin (iltihapla ilişkili proteinlerin) salınımını artırabilir. Aşırı ER yanıtı (EOR), bu ER stresi durumunda bir yanıt olarak ortaya çıkabilir. EOR, ER stresinin aşırı bir şekilde artması ve bu durumda ER'da depolanan Ca^{2+} gibi bileşenlerin serbest bırakılmasıyla ilişkilidir. EOR'nin kaspaz 3 ve 12 gibi apoptotik sinyal yollarını aktive edebileceği ve hücre ölümüne (apoptoz) yol açabileceği düşünülmektedir. Transgenik hayvan modelleri, özellikle HLA-B27 taşıyan transgenik sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar, yanlış katlanmış HLA-B27 proteinlerinin birikimi ve ER stres yanıtının aktive olmasının gözlemlendiği ilk kanıtları sunmuştur. Bu modeller, hastalığa meyilli hayvanlarda HLA-B27 birikimini ve ilişkili patolojik süreçleri anlamak için kullanılmıştır. Ancak, bu konudaki

araştırmalar hala devam etmektedir ve HLA-B27'nin farklı katlanmış yapıları ile ankilozan spondilitin tam olarak nasıl ilişkilendiği konusunda net bir anlayışa henüz ulaşılamamıştır.

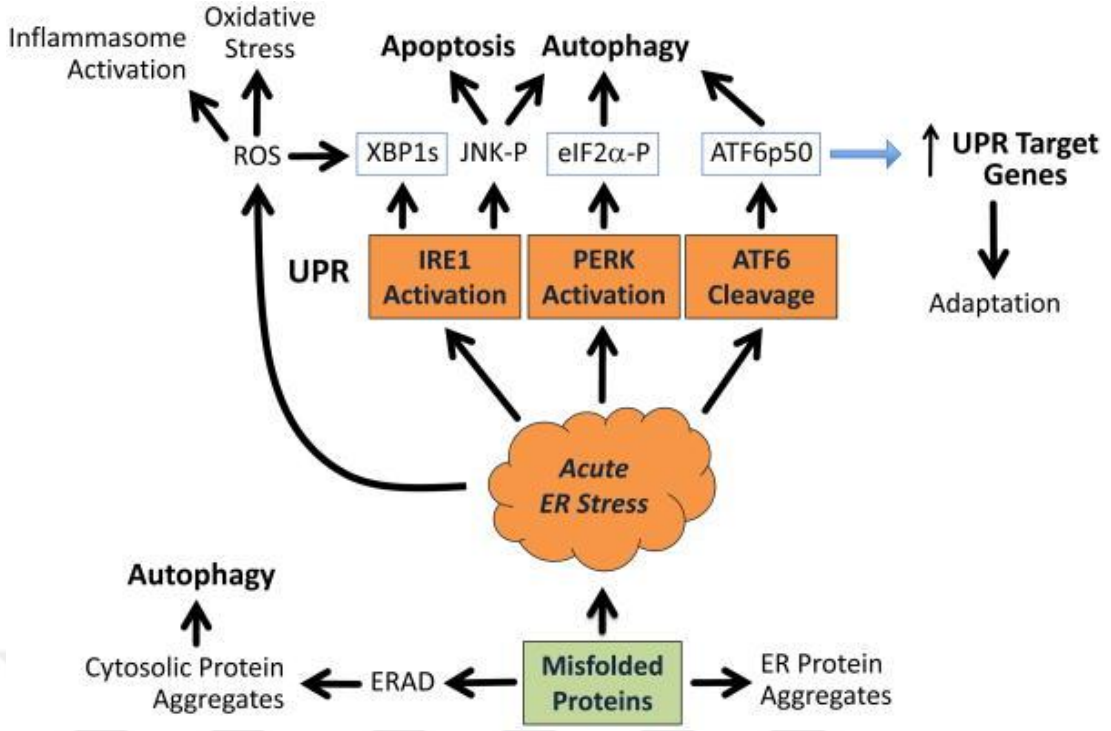
4.2.4.3. Hatalı katlanma hipotezi

Hatalı protein katlanma hipotezi, birçok otoimmün hastalıkta, özellikle de ankilozan spondilit (AS) gibi HLA-B27 ile ilişkilendirilen hastalıklarda, proteinlerin yanlış katlanmasının veya işlenmesinin hastalık gelişiminde rol oynayabileceğini öne süren bir teoridir.

HLA-B27 antijeni, hücre yüzeyinde bulunan ve hücrenin içinden alınan peptite parçalarını sunmak üzere tasarlanmıştır. Bu peptite parçaları, hücrelerin içinde üretilen proteinlerin parçaları olabilir ve bu parçalar bağışıklık sistemine sunularak T hücreleri gibi bağışıklık hücreleri tarafından tanınabilir. HLA-B27 antijeni, bir alfa zincirinden ve bir beta2-mikroglobulin adı verilen başka bir zincirden oluşur. Alfa zincir, antijen sunumunu gerçekleştiren bölümdür ve antijenle birlikte belirli peptitleri taşır. Beta2-mikroglobulin, alfa zincirinin stabilitesine ve yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan diğer zincirdir.

HLA-B27 antijeni gibi MHC sınıfı I molekülleri, genellikle ER (Endoplazmik Retikulum) gibi hücre içi organellerde sentezlenir ve burada peptite parçaları ile birleşir. Bu süreçte, antijenin doğru katlanması ve yapısal bütünlüğü önemlidir. Doğru katlanma, antijenin düzgün bir şekilde üç boyutlu yapısını almasını sağlar, böylece peptite parçaları için bir bağlama yeri oluşturur. Ancak, bazı durumlarda HLA-B27 antijeni yanlış katlanabilir. Yanlış katlanma, antijenin doğru yapısını alamamasına ve yanlış şekilde işlem görmesine neden olabilir. Bu durum, anormal proteinlerin birikmesine ve bağışıklık sistemi tarafından yanlış şekilde tanınmasına yol açabilir. Yanlış katlanmış HLA-B27 proteinlerinin bağışıklık sistemine sunulması, ankilozan spondilit gibi otoimmün hastalıkların gelişiminde bir rol oynayabilecek otoimmün yanıtlara yol açabilir.

Yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER fonksiyonunu bozarak ER stresine neden olabilir. ER aracılı yıkım yolağı (*ER-associated degradation*, ERAD) gibi kalite kontrol süreçleri, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini önleyebilir ve böylece ER stres yanıtını engelleyebilir (Ellgaard ve Helenius, 2003). Ancak, bir yanlış katlanmış proteinin ERAD ile etkili ve tamamen parçalanıp paralanmayacağı, tam olarak anlaşılamayan bazı faktöre bağlıdır. Son yıllarda, otofajinin ER homeostasisini korumada önemli bir rol oynadığı ve daha geniş bir 'entegre stres yanıtı'nın bir parçası olduğu anlaşılmıştır (Kroemer vd. ve ark., 2010). Otofaji, hücreSEL içeriğin lizozomal parçalanmayı sağlayan korunmuş ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir yolak olarak bilinir (Kundu ve Thompson, 2008). Otofajinin bazal seviyeleri çoğu hücrede mevcuttur ve bu yolak, hücreSEL farklılaşma sırasında veya besin yoksunluğu, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi veya protein agregasyonu gibi bir dizi uyarıcı tarafından artırılabilir.



Şekil 4. ER proteinlerinin yanlış katlanmasının sonuçları (Robert A. Colbert ve ark., 2014)

Yanlış katlanmış ER proteinleri, ERAD ile ortadan kaldırılabilir (Şekil 4); bu süreç ER'den sitozole, ardından ubiquitinlenme ve proteazomal parçalanma yoluyla gerçekleşir. Olağandışı proteinlerin temizlenmesine, özellikle ERAD yetersiz kaldığında veya sitozolik proteinler bir araya geldiğinde, otofaji katkıda bulunur. Stres yanıtı yollarını aktive etmeyen ER protein agregatları, hücresel bozukluğa katkıda bulunabilir. Yanlış katlanmış veya açılmamış proteinlerin varlığında BiP (*Binding Immunoglobulin Protein*), akut bir ER stres yanıtı sinyal verebilir; bu da IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonuna izin verir. XBP1 ve ATF6p50 aktif transkripsiyon faktörleridir ve eIF2 α fosforilasyonu (P), ATF4 ve CHOP gibi iki ek UPR transkripsiyon faktörünün translasyonel indüksiyonuna yol açar; bu faktörler birlikte, proteinleri katlama ve salgılama yeteneğini artıran transkripsiyonel değişiklikleri orkestrasyonlar. Bu süreç, ER stresini azaltarak başarılı bir UPR'dan sonra transkripsiyonel değişikliklerin azalmasıyla sonuçlanır ve adaptasyona neden olur; bu da sonraki bir ER stres yanıtı için eşiği değiştirebilir.

Katlanmamış Protein Yanıtı (*Unfolded Protein Response, UPR*) ve ERAD, hücredeki protein kalitesinin kontrol edilmesi ve düzeltilmesinde önemli rol oynarlar. UPR, yanlış katlanmış proteinlerin varlığında hücredeki dengeyi korumak için hızlı bir yanıt mekanizması sunarken, ERAD bu proteinlerin hücreden uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Bu mekanizmalar, hücredeki stres durumlarını azaltarak hücrenin normal fonksiyonlarını devam ettirmesine yardımcı olur.

4.2.4.3.1. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

UPR, hücredeki ER stresine yanıt olarak ortaya çıkar ve hücrenin içindeki dengeli durumu korumayı amaçlar. Yanlış katlanmış veya birikmiş proteinlerin varlığı, ER'de normal protein katlanması sürecini bozar. Bu durumda, UPR, hücredeki anormal durumu düzeltmeye veya hücreyi adaptasyon sağlamaya çalışır. UPR, üç ana ER transmembran protein kompleksi (IRE1, PERK ve ATF6) aracılığıyla aktive olur.

- a) **IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*)**: Yanlış katlanmış proteinlerin birikimi durumunda, IRE1 aktive olur. IRE1, hücrede XBP1 mRNA'sını (X-box binding protein 1) keser ve aktif XBP1 (XBP1s) adı verilen bir form oluşturur. XBP1s, UPR'nin hücredeki adaptasyon süreçlerini yönetir ve ER stresine yanıt olarak hücredeki protein katlanma kapasitesini artırabilir.
- b) **PERK (*Protein Kinase R-like ER Kinase*)**: ER stresine yanıt olarak aktive olan PERK, hücredeki protein sentezini geçici olarak durdurur. Bu durum, hücrenin yeni proteinlerin sentezini azaltarak ER stresi ile başa çıkmasına yardımcı olur. PERK, eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha) adı verilen bir translasyon faktörünü fosforile eder. Bu fosforilasyon, mRNA'ların translasyonunun azalmasına neden olarak yeni protein sentezini kontrol eder. Ayrıca, PERK, apoptozun başlatılmasına neden olabilen bir dizi transkripsiyon faktörünü (ATF4 ve CHOP) aktive edebilir; bu da nihai olarak sıkıntılı hücrelerin uzaklaştırılmasına yol açabilir.
- c) **ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*)**: ER stresi durumunda aktive olan ATF6, özel genleri aktive eder. Bu genler, ER stresine yanıt olarak hücredeki protein katlanma kapasitesini artırmaya ve ER stresine yanıt olarak hücreyi desteklemeye çalışır.

UPR, yanlış katlanmış veya birikmiş proteinlerin varlığında hücredeki homeostazi korumayı amaçlar. Bu mekanizma, hücredeki anormal proteinlerle başa çıkmak için bir dizi adaptif süreci başlatarak, ER stresine karşı hücreyi korumaya çalışır. Ancak, aşırı veya uzun süreli ER stresi durumunda, UPR'nin aşırı aktive olması hücrede olumsuz sonuçlara, hatta apoptoza (programlı hücre ölümü) yol açabilir.

BiP (*Binding Immunoglobulin Protein*), *Unfolded Protein Response* (UPR) sırasında önemli bir rol oynayan bir chaperone proteindir. Chaperon proteini, hücrelerde proteinlerin doğru katlanmasını ve stabilitesini sağlayarak yanlış katlanmış veya birikmiş proteinlerin düzenlenmesine yardımcı olur. BiP, normal koşullarda bazı transmembran ER proteinlerine bağlanarak onları inaktive eder. Ancak, yanlış katlanmış veya birikmiş proteinlerin artmasıyla, BiP bu proteinlerle etkileşime girer. BiP, bu durumda yanlış katlanmış proteinlerin üzerine bağlanarak onları korur ve hücredeki ER stresi sırasında bu proteinlerin düzenlenmesine

yardımcı olur. BiP'nin bu rolü, UPR sırasında ER stresinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. ER stresinin artmasıyla, BiP yanlış katlanmış veya birikmiş proteinleri stabilize eder ve hücrenin bu stres durumuna tepki vermesine yardımcı olur. Bu süreç, hücredeki homeostazın korunmasına ve yanlış katlanmış proteinlerin düzenlenmesine katkıda bulunur.

4.2.4.3.2. UPR ve sitokin düzenlenmesi

Sitokinler, hücreler arasında iletişim kurmaya ve bağışıklık sistemini düzenlemeye yardımcı olan proteinlerdir. UPR, ER stresine tepki olarak hücre içindeki birçok sinyal yolu üzerinde etkili olabilir ve bazı durumlarda sitokin düzenlemesine katkıda bulunabilir. ER stresi durumunda, UPR'nin sitokinlerin üretimi veya salınımı üzerinde etkileri olabilir.

İnterlökin-23 (IL-23) ve İnterlökin-17 (IL-17) gibi bağışıklık sistemiyle ilgili moleküller, AS patogenezinde önemli bir rol oynayan bir aks oluşturabilir. IL-23, bağışıklık sistemi hücrelerini aktive eden bir sitokindir. Th17 hücreleri, IL-17 üreterek iltihaplanmayı tetikler. IL-17, iltihaplı yanıtları düzenleyen bir sitokin olarak bilinir ve bu yanıtların aşırı ve kronik hale gelmesine katkıda bulunabilir. IL-17'nin, eklemlerdeki sinovyal zarı etkileyebilecek ve eklem iltihabına neden olabilecek bir etkisi vardır. IL-17, kemik rezorpsiyonu tetikleyerek, kemiklerde anormal büyümelere ve hasara yol açabilir. IL-23/IL-17 aksı, bağışıklık sisteminin denge dışı yanıtlarına katkıda bulunarak otoimmün tepkileri uyarabilir.

AS'de yaygın olarak salgılanan sitokinler arasında Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-17 (IL-17), İnterlökin-1 beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinler bulunmaktadır. Bu sitokinler iltihaplanma süreçlerini artırabilir, osteoklast aktivitesini artırarak kemik hasarına neden olabilir ve bağışıklık sisteminin hücrelerinin etkileşimlerinde rol oynayabilir. Bu mekanizmaların net etkisi, hücre tipine, stres şiddetine ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Ankilozan spondilit (AS), bahsedilen proinflamatuvar sitokinlerin artmış düzeylerine bağlı olarak iltihaplanma süreçleriyle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, AS hastalarında genellikle serum ve eklem sıvısında yüksek seviyelerde proinflamatuvar sitokinler tespit edilmiştir.

AS'nin tedavisinde, TNF- α inhibitörleri gibi ilaçlar, bu sitokin seviyelerini düşürmeye ve iltihaplanma süreçlerini kontrol etmeye yönelik olarak kullanılabilir. Bu tedavi yaklaşımı, semptomların şiddetini azaltmaya ve hastalığın seyrini yönetmeye yardımcı olabilir. Bu çalışmanın amacı, hastalığın immün mekanizmalarının aydınlatılması için HLA-B27 (+) ve HLA-B27 (-) AS gruplarında ve sağlıklı kontrollerde, yanlış katlanan proteinlerin hastalık seyrine etkisi ve ER stresine bağlı sitokin salınımlarının sağlıklı kontrollere göre değişimini incelemektir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubuna, 8 Ekim 2021 tarihli 09.2021.1133 protokol kodlu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayının ardından, İç Hastalıkları ABD Romatoloji BD polikliniğine başvuran Assessment of SpondyloArthropathies (ASAS) ve New York Kriterlerine göre Ankilozan Spondilit tanısı kesinleşmiş ve aydınlatılmış onam vermeyi kabul eden 30 AS hastası dahil edilmiştir. Otoimmün/otoinflamatuvar hastalığı olmayan eş sayıda sağlıklı kontrol grubunu, aydınlatılmış onam veren sağlıklı gönüllüler oluşturmaktadır. Alınan tüm kan örnekleri, rutin biyokimyasal testler için başvuran bireylerden toplanmıştır. Çalışmaya katılmak için erişkin olmak dışında belirlenen bir yaş kısıtlaması bulunmamaktadır. Tüm hastalarda periferik kan örnekleme öncesinde aydınlatılmış onam alınmış ve hastaların demografik verileri, hastalık bilgileri ve tedaviye yönelik maddelerden oluşan hasta formu doldurulmuştur. Ankilozan Spondilit için New York sınıflandırma kriterlerini karşılayan HLA-B27 (+) ve HLA-B27 (-) hasta ve sağlıklı kontroller çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) kullanılarak spinal hareketlilik, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) kullanılarak fonksiyonel kapasite ve Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) kullanılarak hastalık progresyonu açısından değerlendirilmiştir.

5.2. Kullanılan Aletler

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu -80°C, Thermo (A.B.D)

Derin Dondurucu -20°C, Bosch (Almanya)

Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D)

Otoklav, All American (A.B.D)

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)

Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)

Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D)

LightCycler 480, Roche (İsviçre)

CytoFLEX, Beckman Coulter (A.B.D)

Thermal Cyclers, Bio-Rad (A.B.D)

ELISA Reader, Agilent (A.B.D)

5.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Falkon Tüp 50 mL, TPP (İsviçre)

Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)

Eppendorf Tüp 1,5 mL, Axygen (A.B.D)

Eppendorf Tüp 2,0 mL, Axygen (A.B.D)

Mikropipet Uçları, Axygen (A.B.D)

Filtreli Mikropipet Uçları, Axygen (A.B.D)

Eppendorf Tüp 0,5 µL, Axygen (A.B.D)

5.4. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

Etanol, Merck, (Almanya)

Moleküler Biyoloji Sınıf Saf Su, AppliChem, (A.B.D.)

PBS, AppliChem, (A.B.D.)

RNAz free su, Sigma, (A.B.D.)

Lymphocyte Separation Medium Ficoll, Capricorn Scientific (Almanya)

BIOLEGEND PE Goat anti-mouse IgG

BIOLEGEND Alexa Fluor 647 anti-human HLA-A,B,C

Thermo Fisher CD45 Polyclonal Antibody

Thermo Fisher HLA Class I Heavy Chain Monoclonal Antibody (HC10)

EcoPure Genomic DNA Kit, Eco-Tech (Türkiye)

EcoPure Total RNA Kit, Eco-Tech (Türkiye)

SensiFAST cDNA Synthesis Kit , Bioline (A.B.D)

ELISA Kit, AFG Bioscience (A.B.D)

SensiFAST SYBR No-ROX Kit, Bioline (A.B.D)

5.5. Kullanılan Primerler

Primerler <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> üzerinden tasarlandıktan sonra ürettirilerek, liyofilize formda satın alınmıştır, ana stok için steril distile su ile sulandırılmıştır ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.

5.6. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır.

RNA İzolasyonu

a) Yıkama Tamponu 2

Kitte sağlanan Wash Buffer’ın üzerine 32 ml %100 ethanol (EtOH) eklendi.

Eliza ile Plazmadaki Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

b) Yıkama Tamponu

Kitte sağlanan 20 ml yıkama tamponu alınarak (30x) distile su ile totalde 600 ml olacak şekilde seyreltilmiştir.

5.7. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PBMC) ve Plazma İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden PBMC izolasyonu *Lymphocyte Separation Medium Ficoll* (yoğunluk; 1,077 g/mL) (Capricorn Scientific) kullanılarak yoğunluk gradient santrifüjlemesi yöntemi ile aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Jia vd.,2017). PBMC izolasyonu, kan alım işleminden sonra <4 saatte oda sıcaklığında bekletilen kanlardan gerçekleştirildi (Mallone vd., 2011).

- 2 ml kan örneği, 2 ml fosfat tamponlu salin (PBS) (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) (oda sıcaklığındaki) solüsyonu ile seyreltildi.
- PBS ile seyreltilmiş kan örnekleri 4 ml Ficoll’ün üzerine eklendi ve 1000 g x 30 dakika 20°C’de (*with no brake*) santrifüj edildi.
- İlk santrifüjün ardından sırasıyla; en üstte plazma, PBMC katmanı, Ficoll katmanı, granülosit katmanı ve tüpün en altında eritrosit katmanı oluşturacak şekilde hücre ayrışmaları elde edildi.
- Üstteki plazma pipet yardımıyla kriyojenik tüplere alınıp -20°C’de saklandı ve PBMC’ler 15 ml’lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Mononükleer hücrelerin üzerine üç hacim PBS eklenerek yıkandı ve 250 g x 10 dakika 20°C’de (*brake on*) santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
- Son olarak PBMC’ler PBS içinde yeniden süspanse edildi

- h) İzolasyondan sonra hücreler Hematoloji Analizöründe düşük WBC modunda sayıldı. Lenfosit ve monositlerin mutlak hücre sayılarının, tüm PBMC sayısını temsil ettiği ve bu hücrelerin yüzdesinin geri kazanılan PBMC'lerin saflığı olduğu kabul edildi (Jia vd.,2017).
- i) Hücreler sayıldıktan sonra, PBS'i uzaklaştırmak için 250 g x 10 dakika 20°C'de (brake on) santrifüj edilir.
- j) Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı, hücreler kriyojenik tüplere alındı ve -80°C'de saklandı.

5.8. RNA İzolasyonu

Periferik kandan RNA izolasyonu Ecotech EcoPure Total RNA Kit (Cat No: E2075) kullanılarak, kitin yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

- a) 100 µl taze kan RNase içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- b) Her 100 µl kan örneğine 400 µl Lysis Binding Buffer eklenir. Pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve 10 saniye vorteks yapıldı.
- c) Lizata 400 µl etanol (%96-100) eklendi ve 10 saniye vorteks yapılarak karıştırıldı.
- d) Toplama tüpüne kolon yerleştirildi ve lizat kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
- e) Toplama tüpü atıldı. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi ve 400 µl Yıkama Tamponu 1 eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
- f) Toplama tüpü atıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl Yıkama Tamponu 2 eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
- g) Toplama tüpü döküldü ve 200 µl Yıkama Tamponu 2 eklenerek maksimum hızda 2 dakika santrifüj yapıldı.
- h) Kolon temiz RNase içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- i) Kolona 30-50 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- j) Oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüj yapıldı.
- k) Kolon atıldı ve saflaştırılmış RNA kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

5.9. RNA'dan cDNA Sentezi ve Gen Ekspresyon Analizi

İzole edilip -80°C'de saklanan RNA'lardan cDNA sentezi SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, BIO-65053) yardımıyla kitin yönergelerine uygun olarak yapılmıştır.

- a) cDNA sentezine başlamadan önce -80°C'de saklanan RNA tüplerinin erimesi sağlanmış ve çalışmaya başlamadan önce 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- b) Tüm RNA tüpleri ve reaksiyon için gerekli malzemeler çalışma boyunca buzda bekletilmiştir

- c) Kitin solüsyonları reaksiyon karışımını hazırlamadan önce vortekslenmiştir.
d) Reaksiyon karışımı tabloda verilen hacimlerde bir tüp içinde hazırlanmıştır.

Tablo 5. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

- Total RNA / mRNA (1 µg'a kadar)	- n µl
- 5X TransAmp Buffer	- 4 µl
- Reverse Transcriptase	- 1 µl
- DNase/Rnase free su	- Up to 20 µl

- a) Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra RNA'lar aşağıda belirtilen programa uygun olarak ısı döngü cihazına (*thermal cycler*) konulmuştur.
b) Elden edilen cDNA ürünleri *XBPI*, *ATF6*, *IRE1* ve *PERK* gen ekspresyon çalışmasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 6. cDNA protokolü

25°C	10 dakika (primer bağlanma)
42°C	15 dakika (ters transkripsiyon)
85°C	5 dakika (inaktivasyon)
4°C	10 dakika

Gen Ekspresyon Analizi

Çalışmaya başlamadan önce elde edilen cDNA'lara 20 µl su eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan *XBPI*, *ATF6*, *PERK*, *IRE1* ve *GAPDH* primerleri liyofilize formda alınıp steril distile su ile sulandırılarak ana stok oluşturulmuş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- a) Çalışma Light Cycler 480 RT-PCR cihazında Bioline SensiFAST SYBR No-ROX Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
b) Kitin solüsyonları reaksiyon karışımını hazırlamadan önce vortekslenmiştir.
c) Reaksiyon karışımı tabloda verilen hacimlerde hedeflenen gen ve housekeeping gen için ayrı 5 tüp içinde hazırlanmıştır.
d) 96 kuyulu Real Time PCR plate'inin her bir kuyusuna hazırlanan karışımdan 15 µl dağıtılıp, daha sonra her bir kuyucuğa 5 µl cDNA eklenmiştir.
e) Hazırlanan plate Light Cycler 480 RT-PCR cihazına yerleştirilerek döngü koşulları oluşturulmuş ve analiz gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. RT-PCR reaksiyon içeriği

	<i>GAPDH</i>		<i>XBPI</i>		<i>PERK</i>		<i>IRE1</i>		<i>ATF6</i>	
	Hacim	Final Kons	Hacim	Final Kons	Hacim	Final Kons	Hacim	Final Kons	Hacim	Final Kons.
2X SensiFAST SYBR	10 µl	1X	10 µl	1X	10 µl	1X	10 µl	1X	10 µl	1X
10 µM F Primer	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM
10 µM R Primer	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM	0,8 µl	400nM
Su	3,4 µl		3,4 µl		3,4 µl		3,4 µl		3,4 µl	

Tablo 8. PZR döngü koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman	Not
	95°C	2 dakika	Polimeraz aktivasyon
	95°C	5 saniye	Denatürasyon
	60-65°C	10 saniye	Primer Bağlanması
	72 °C	20 saniye	Uzama

5.10. Eliza ile Plazmadaki Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örneklerinden ELIZA yöntemi (AFG Bioscience) ile TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-17 düzeyleri ölçülerek inflamatuvar sitokinler değerlendirilmiştir. Eliza kitin yönergelerine uygun olarak aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Periferik kandan elde edilen serum örnekleri 2000-3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından supernatant alikotlanarak çalışma yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır (Serum örnekleri kuyucuklara dağıtılana kadar buz üzerinde tutulmuştur).
- Çalışmaya başlamadan önce, 600 ml 1X konsantrasyonda yıkama tamponu hazırlanmıştır. Bunun için 20 ml yıkama tamponu alınarak (30x) distile su ile seyreltilmiştir
- Çalışmanın standartlarını oluşturmak için ilk olarak her standart tüpüne 50µl standart dilüent eklenmiş, ardından aşağıdaki tabloda verildiği şekilde seri dilüsyon yapılmıştır.

Tablo 9. Eliza standart miktarları

Tüp	6	5	4	3	2	1	0
ng/L	18X	12X	8X	4X	2X	X	0

- Kullanılacak tüm standartlar ve kimyasallar hazırlandıktan sonra, standart kuyularına 50 µl standart dilüent eklenmiştir.
- 6 Örnek kuyularına 40 µl örnek dilüent eklendikten sonra, dilüentin üzerine 10 µl serum eklenip örneklerin seyreltilmesi sağlanmıştır.

- c) Tüm örnekler ve standartlar dağıtıldıktan sonra plate kapatılarak 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- d) İnkübasyonun ardından kuyulardaki sıvı uzaklaştırılıp, tüm kuyulara yıkama solüsyonu eklenmiştir. 30 saniye bekledikten sonra yıkama solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.
- e) Yıkama işlemlerinin sonra blank kuyusu haricindeki tüm kuyulara 50 µl HRP-Konjugat solüsyonu eklenerek plate kapatılmıştır ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- f) İnkübasyonun ardından kuyulardaki sıvı uzaklaştırılıp, tüm kuyulara yıkama solüsyonu eklenmiştir. 30 saniye bekledikten sonra yıkama solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.
- g) Yıkama aşamasından sonra tüm kuyulara 50 µl Chromogen Solüsyon A ve 50 µl Chromogen Solüsyon B eklenerek ve 37°C’de 15 dakika karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir.
- h) İnkübasyondan sonra tüm kuyulara 50 µl Stop Solüsyonu eklenerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. (Bu aşamada kuyulardaki mavi rengin sarıya dönmesi beklenmektedir).
- i) Stop Solüsyon eklendikten sonra (15 dakika içinde) Eliza okuyucuda 450 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. (Blank kuyusu 0 olarak hesaplanacaktır).

5.11. Akış Sitometrisi ile Hatalı Katlanan Proteinlerin Tespiti

İzole edilip -80°C’de saklanan PBMC tüplerinin erimesi sağlanmış ve çalışmaya başlamadan önce vorteks yapılmıştır. PE Goat anti-mouse IgG (BIOLEGEND,405307), Alexa Fluor 647 anti-human HLA-A,B,C (BIOLEGEND, 311414), CD45 Polyclonal Antibody (Thermo Fisher,20103-1-AP) ve HLA Class I Heavy Chain Monoclonal Antibody (HC10) (Thermo Fisher, MUB2037P) antikoları kullanılarak aşağıdaki yönergeye göre gerçekleştirilmiştir.

- a) Eriyen ve vortekslenen PBMC örnekleri 15’lik falkonlara alınarak, 14 mL PBS eklenmiştir.
- b) 1700 x g ‘de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve sonrasında supernatant uzaklaştırılmıştır.
- c) Oluşan pelletin üzerine 2 mL PBS eklenerek vorteks yapılmıştır.
- d) Boş akış sitometrisi tüplerine 1 mL HC10 antikoru eklenmiştir. Sonrasında, PBS ile hazırlanan hücreden 500 µl eklenerek vorteks yapılmıştır.
- e) 30 dakika +4°C’de inkübe edilmiştir.
- f) Kontrol için, 2 µl izotip kontrol (IgG) ve 200-300 µl PBS ile hazırlanan hücre yeni bir tüpe eklenerek vortex yapılmıştır. 30 dakika +4°C’de inkübe edilmiştir.
- g) İnkübasyon sonrası hasta ve kontrol tüplerine 2 mL PBS eklenerek vorteks yapılmıştır.
- h) 1700 x g ‘de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve sonrasında supernatant uzaklaştırılmıştır.

- i) Üzerlerine 10 µl PE eklenerek vorteks yapılmıştır. Sonrasında 30 dakika +4°C’de inkübe edilmiştir.
- j) İnkübasyon sonrası yıkama için, hasta ve kontrol tüplerine 3 mL PBS eklenerek 1700 x g ‘de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve sonrasında supernatant uzaklaştırılmıştır. Üzerine 2 mL PBS eklenerek vorteks yapılmıştır. Kontrol tüpü akım sitometrisi cihazına okutularak, analizi yapılmıştır.
- k) Hasta ve sağlıklı kontrollerin inkübasyonunun ardından, T hücrelerine bağlanan CD3 antikoru 5 µl, monositlere bağlanan CD14 antikoru 2,5 µl, B hücrelerine bağlanan CD20 antikoru 2,5 µl ve doğru katlanan proteinlere bağlanan W6/32 antikoru 5 µl olarak tüplere eklenerek vorteks yapılmıştır. Sonrasında, 30 dakika +4°C’de inkübe edilmiştir.
- l) İnkübasyon sonrası tüplere 2 mL PBS eklenerek vorteks yapılmıştır ve akım sitometrisi cihazına okutularak analizi yapılmıştır.

Tablo 10. Akım sitometrisinde kullanılan antikorlar ve antikor işaretleri

Floresan	Antikor
FITC	CD3
PE	HC10
Alexa Flow 647 (APC)	CD14
FITC	CD3
V450	CD20

6. BULGULAR

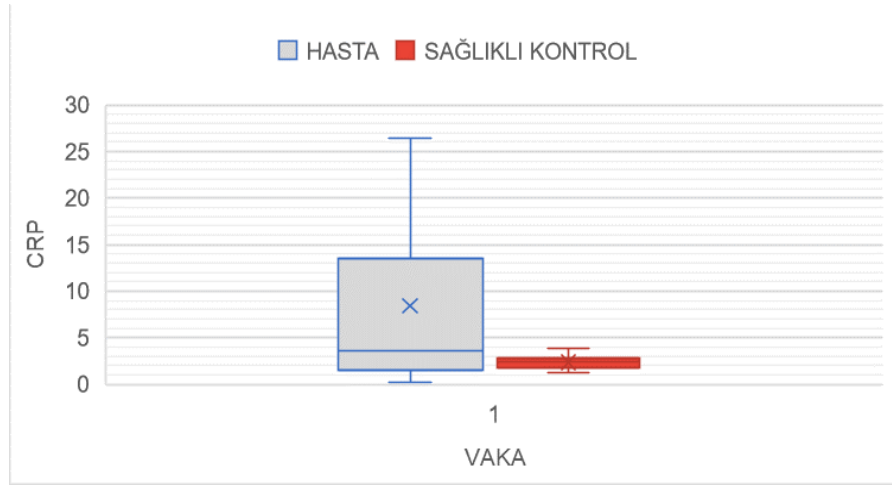
Çalışmaya 30 AS hastası (20 erkek, 10 kadın) ve 30 sağlıklı birey (15 erkek, 15 kadın) olmak üzere toplam 60 birey alındı. Çalışmaya katılan 30 hastanın demografik verileri incelendiğinde yaş, cinsiyet, medeni ve eğitim durumu benzerdi. Hasta ve sağlıklı bireylerin ortalama yaşı sırasıyla $45,3\pm 11,58$ ve $43,45\pm 8,21$ yıl idi ve yaş değişkeni açısından gruplar benzerdi. Otuz AS hastasının 27'sinde (%90) HLA-B27 pozitif saptandı. AS hastalarının demografik ve klinik verileri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Hastalık aktivite ölçümleri ile hasta grupları arasındaki karşılaştırma

	Hasta (n=30) (ortalama±mutlak sapma)	Sağlıklı Kontrol (n=30) (ortalama±mutlak sapma)	Anlamlılık Testi (t-test)	P
Yaş	45,3±11,58	43,45±8,21	7.138	4.782
BMI	28,07±4,55	26,32±3,65	1.4376	1.570
BASDAI	3,8± 2,14	-	-	-
BASFI	1,80±2,22	-	-	-
ESR(mm/h)	12,89±8,13	16,3±3,14	1.7841	807
CRP(mg/L)	9,61±11,09	2,36±0,70	2.9097	55

CRP, C-reactive protein; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Function Index; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; BMI, Body Mass Index

AS hastaları ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında CRP değerleri AS hastalarında anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 5). Hasta grubunun klinik parametreleri değerlendirildiğinde, 30 hastanın %23,3'ünde (7 kişi) radyografik sakroiliit varlığı ve %6,66'sında (2 kişi) bambu omurga varlığı gözlenmiştir. 30 hastanın %23,3'ünde (7 kişi) omurga tutulumu saptanmıştır. İskelet dışı tutulumlarda 30 hastanın %10'unda (3 kişi) üveit, %10'unda (3 kişi) entezit izlenmiştir. Hastaların aile öyküsü incelendiğinde 30 hastanın %20'sinde (6 kişi) birinci dereceden yakınında AS tanısı konulmuştur. Hastaların % 10'u sigara kullanımını belirtmiş olup, hastalıkla ilgili anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.



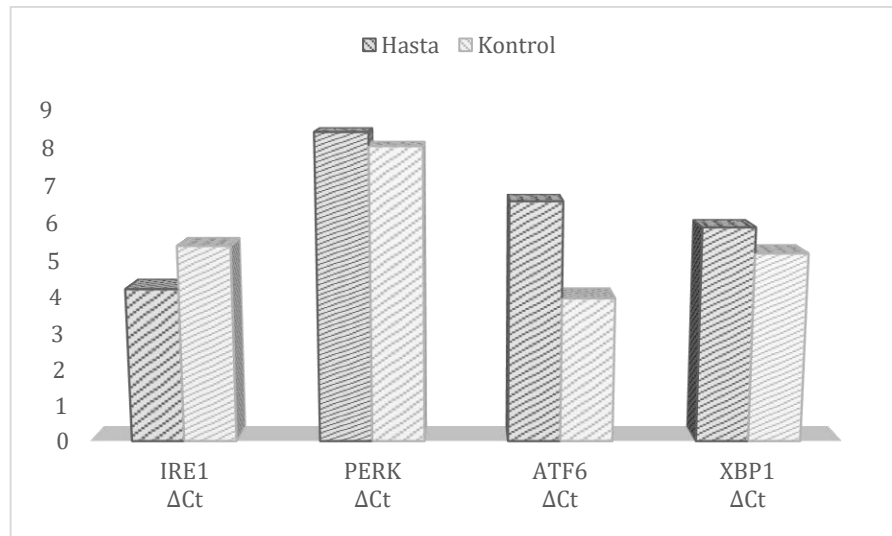
Şekil 5. AS hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında CRP düzeyinin dağılımı

6.1. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Periferik kan örneklerinden elde edilen RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü ve ardından gerçek zamanlı kantitatif PCR ile analiz edilerek göreceli kantifikasyon yöntemiyle değerlendirildi.

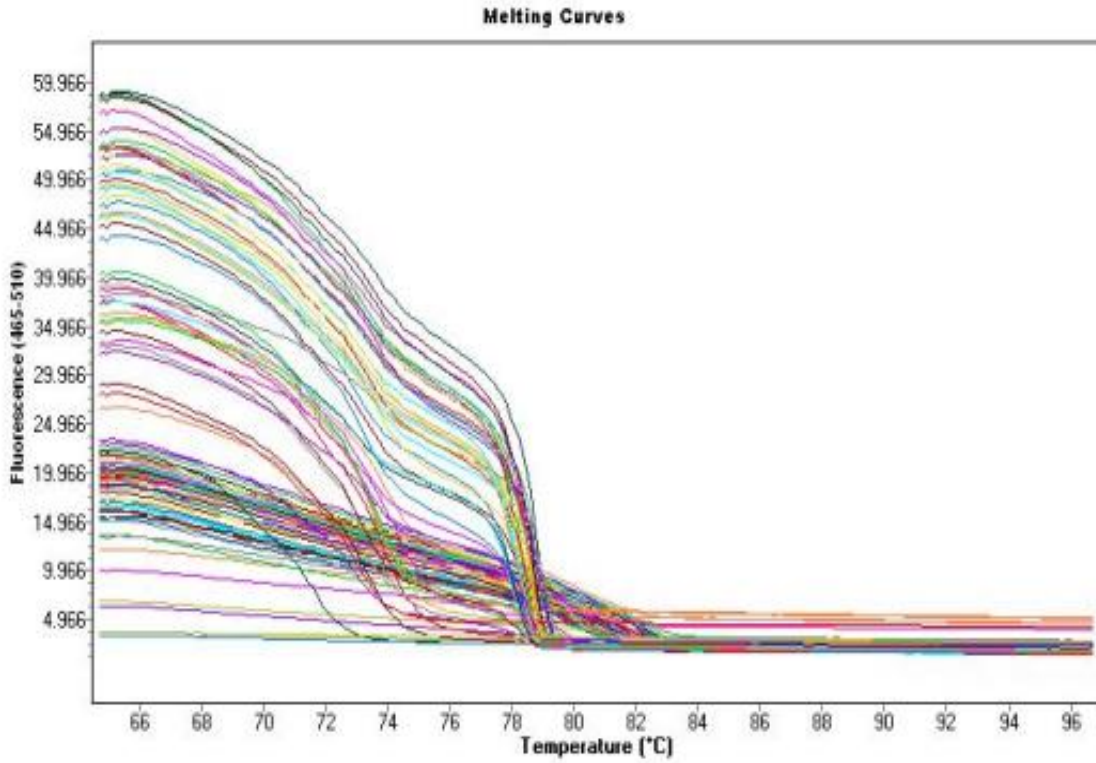
30 hasta ve 30 sağlıklı bireyin analizi yapıldı. Housekeeping olarak kullanılan GAPDH ile normalizasyon yapıldı. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri ile *XBPI*, *ATF6*, *IRE1* ve *PERK* gen ekspresyon analizi yapıldı (Şekil 6). Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması Student t-testi analizi ile yapılmıştır.

XBPI, *IRE1* ve *PERK* gen ekspresyon düzeylerinin Student t-test değerleri sırasıyla $t = 0,255$, $t = 0,462$ ve $t = 0,556$ olarak hesaplanmış olup, hastalar ve sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Buna rağmen, AS hastaları ve sağlıklı kontrollerin *ATF6* gen ekspresyon değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$).

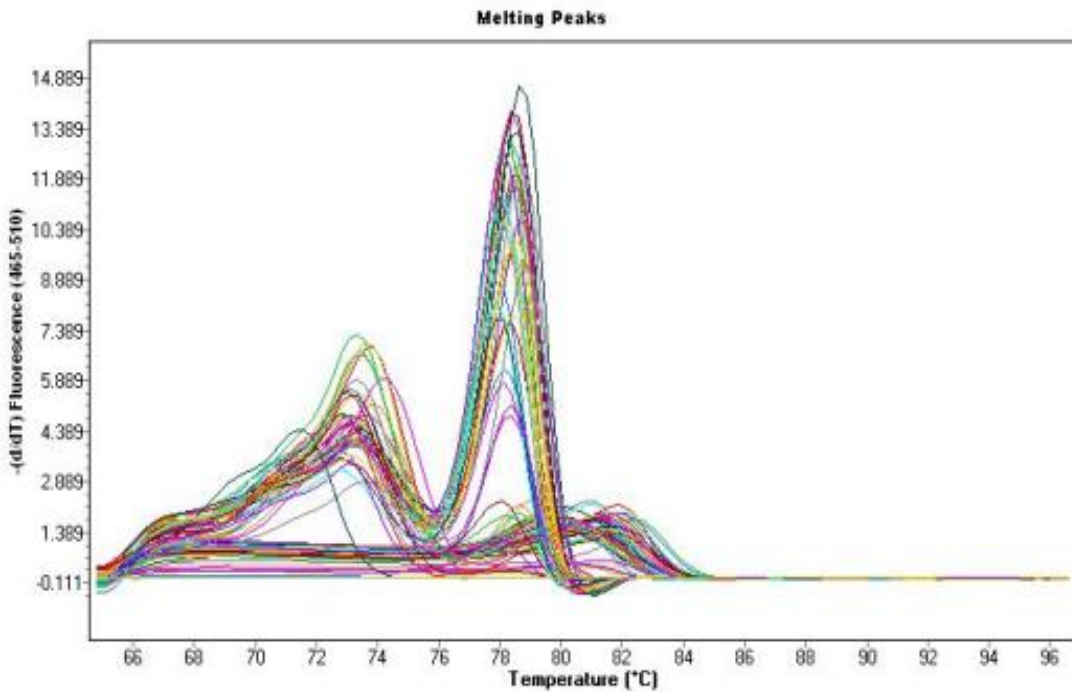


Şekil 6. IRE1, PERK, ATF6 ve XBPI ekspresyon seviyeleri

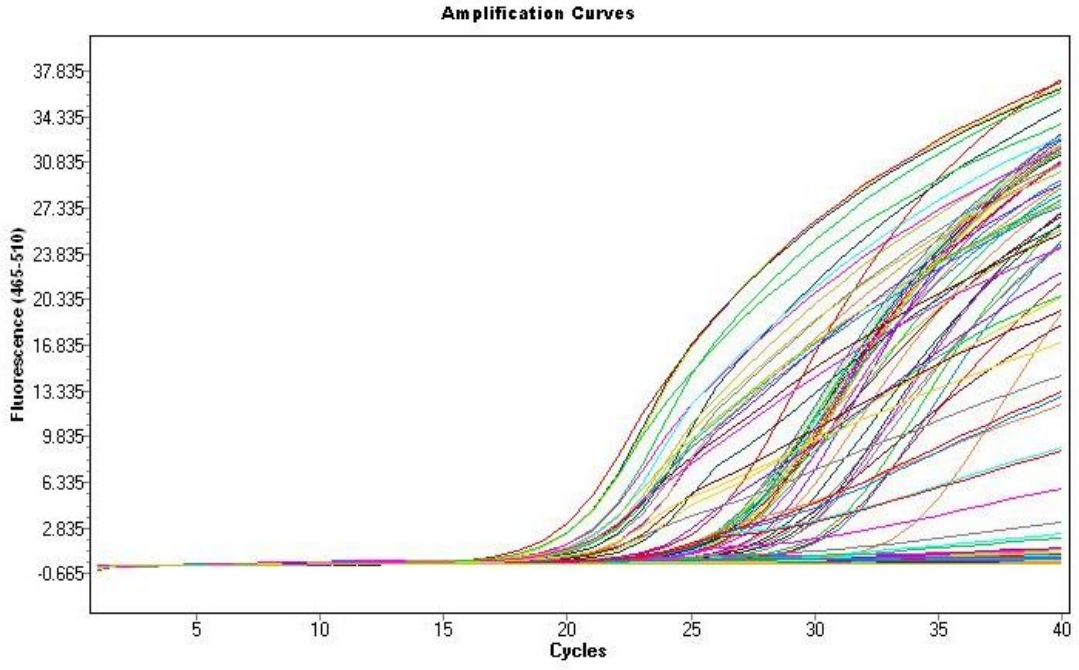
Hasta ve sağlıklı kontrollere ait Gerçek Zamanlı PZR amplifikasyon eğrileri (Şekil 7, Şekil 8), XBP1'e ait erime sıcaklığı eğrileri ve erime pikleri aşağıda verilmiştir



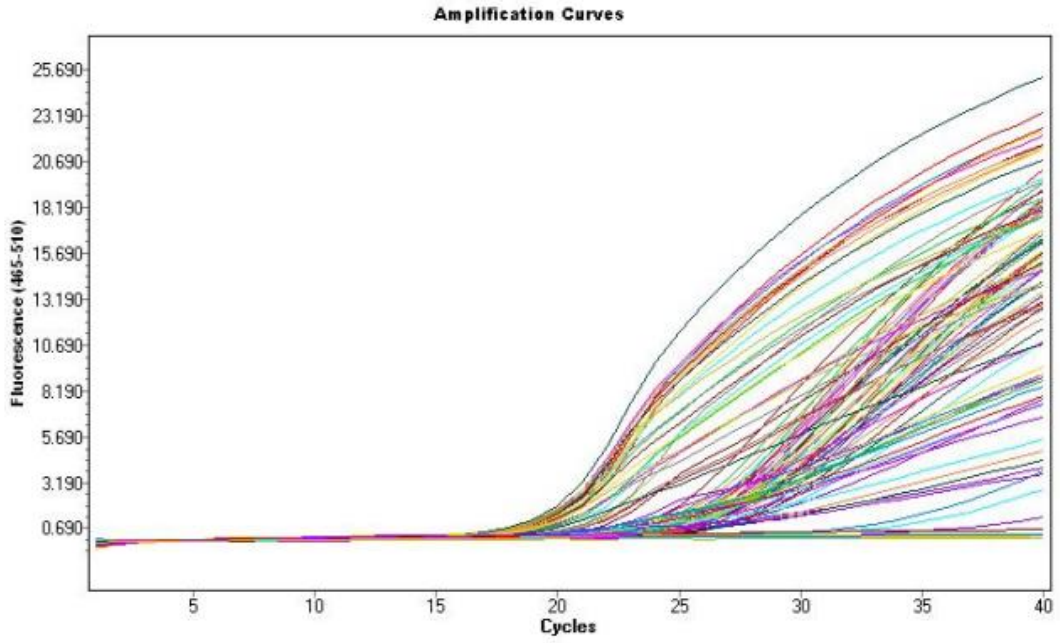
Şekil 7. Hastaların ve sağlıklı bireylerin XBP1 erime sıcaklığı eğrileri



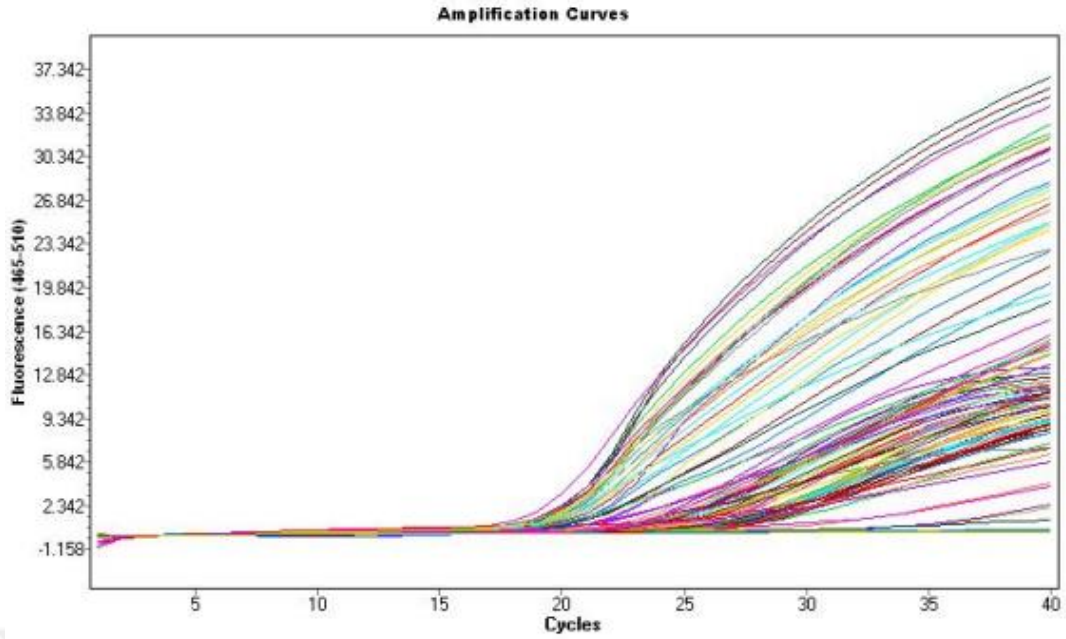
Şekil 8. Hastaların ve sağlıklı bireylerin XBP1 erime pikleri



Şekil 9. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin IRE1 amplifikasyon eğrileri



Şekil 10. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin ATF6 amplifikasyon eğrileri



Şekil 11. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin XBP1 amplifikasyon eğrileri

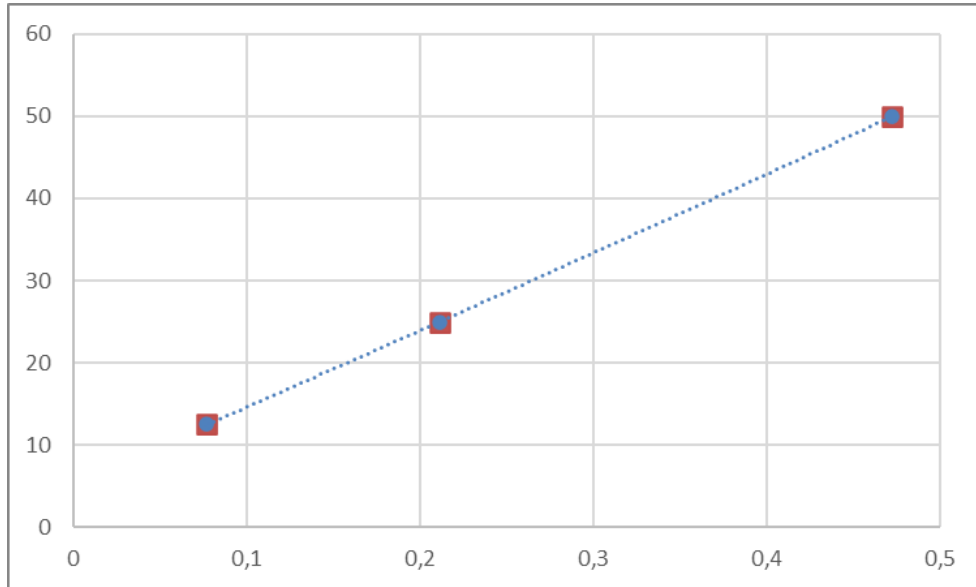
6.2. Eliza Sonuçları

Periferik kan örneklerinden elde edilen serum örneklerinden ELIZA yöntemi ile TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-17 düzeyleri ölçülerek inflamatuvar sitokinler değerlendirilmiştir. 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrolün serumlarında bulunan proinflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonları (Tablo 12, Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15) ve dilüe edilen standartların konsantrasyonları (Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15) aşağıda belirtildiği gibidir. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması Student t-testi analizi ile yapılmıştır.

Hastaların serumlarındaki IL-17, IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde (sırasıyla $t= 0,119827593$, $t= 0,0662005244$, $t= 0,1114285624$) sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, AS hastalarının serumlarındaki TNF- α düzeyleri ($t= 0,02689634079$) sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 12. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar IL-17'nin konsantrasyon değerleri

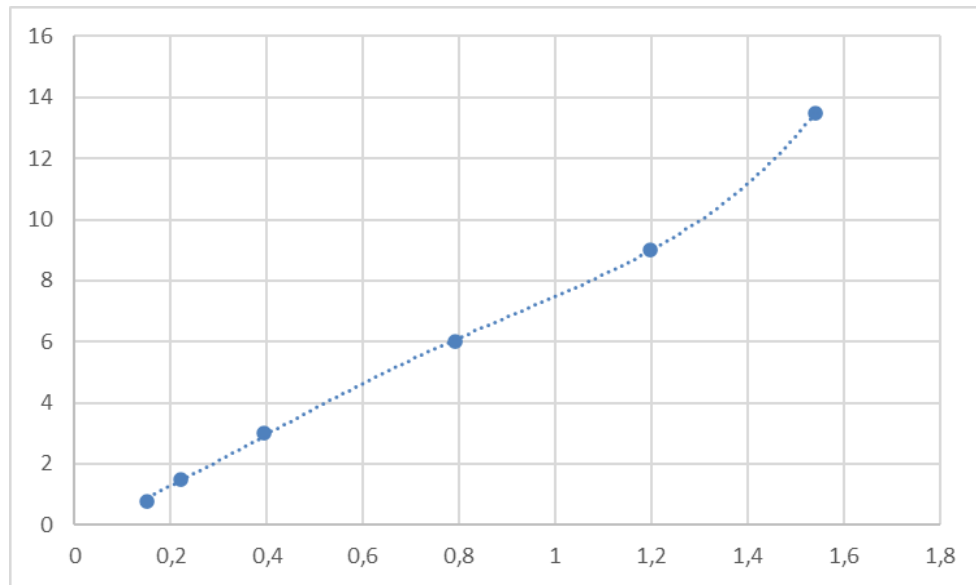
ST1	ST1	IP151	IP152	IP153	IP154	IP155	IP156	IP157	IP158	IP159	IP160
ST2	ST2	IP161	IP162	IP163	IP164	IP165	IP166	IP167	IP168	IP169	IP170
ST3	ST3	IP171	IP172	IP173	IP174	IP175	IP176	IP177	IP178	IP179	IP180
ST4	ST4	IP181	IP182	IP183	IP184	IP185	IP186	IP187	IP188	IP189	IP190
ST5	ST5	K3	K4	K5	K6	K8	K9	K10	K11	K12	K13
BL	BL	K17	K18	K19	K20	K21	K22	K23	K24	K25	K26
K27	K28	K29	K30	K31	K32	IP164	IP175	IP178	IP156	IP180	IP154
IP168	IP182	IP204	K6	K10	K12	K18	K21	K24	K28	K30	K32
		30,898	42,572	25,236	21,116	30,33	39,777	58,701	24,109	22,798	27,589
		30,14	36,899	27,306	76,743	35,084	22,985	38,721	30,33	34,416	76,439
Kons. Pg/mL		44,893	32,417	23,922		22,33	23,36	24,391	22,424	31,183	72,391
		31,847	19,718	20,65	31,847	30,993	23,172	32,512	46,932	32,132	
			67,864	23,734	25,33	24,203	49,952	33,273	26,646	43,055	29,856
		88,928	73,401		80,816	39,681	19,811	27,306	32,322	32,892	67,263
33,273	23,36	24,86	32,132	52,888	28,816	46,543	18,045	25,424	37,857	50,147	35,465
28,627	22,424	21,49	31,562	27,872	31,847	85,94	22,705	25,612	40,162		38,433



Şekil 12. IL-17 standartlarının konsantrasyon değerleri (pg/mL)

Tablo 13. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflatuvar IL-6 konsantrasyon değerleri

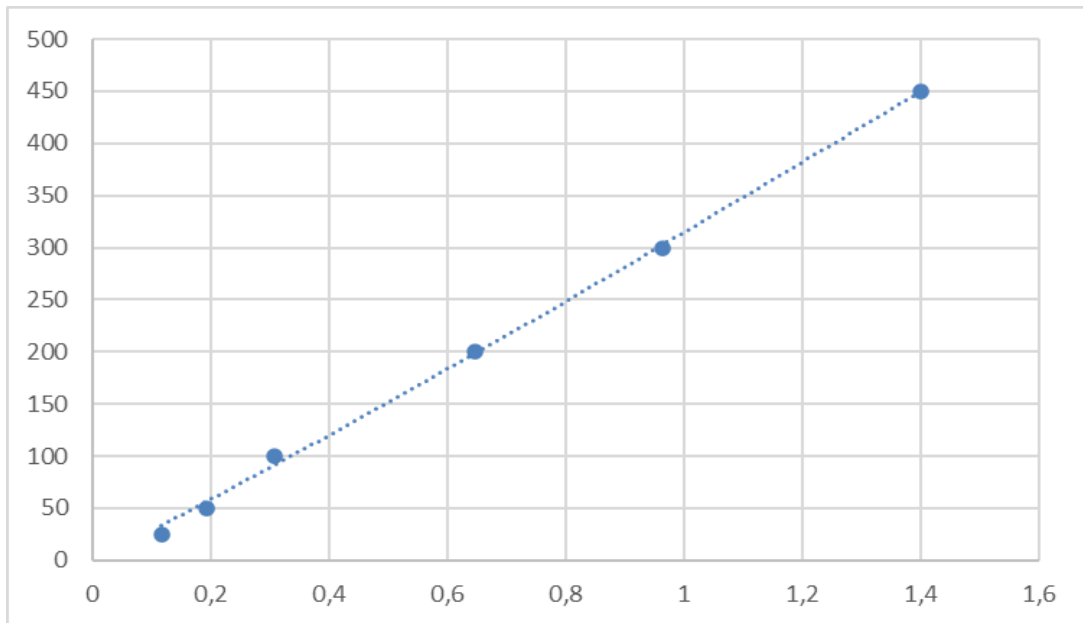
		7,7	8,3	9,2	12,1	9,7	17,6	19,3	7,5	10	11,3
Konsantrasyon ng/L		11,6	8,3	13,9	25,7	9,7	7,2	10,9	6,5	8,5	8,7
		7,5	8,2	7,1	92,9	4,7	8,1	10,8	5,2	6,3	37,1
		7,7	5	6,5	20,3	11	7,4	10,3	7,1	7,3	14,8
		72,6	16,3	9,3	8,6	4,4	10,6	5,4	12,6	14,8	11,6
		17,5	9,6	12,2		70,1	48,7	8	5,9	8,2	24,1
		9,2	7,8	6,6	9,6	8,7	15,3	28,7	6,8	11,2	9
17,2	34,2	9,2	13,8	13,8	20,9	10,8	58	33,1		48,1	6
		IP151	IP152	IP153	IP154	IP155	IP156	IP157	IP158	IP159	IP160
Örnek Kodları		IP161	IP162	IP163	IP164	IP165	IP166	IP167	IP168	IP169	IP170
		IP171	IP172	IP173	IP174	IP175	IP176	IP177	IP178	IP179	IP180
		IP181	IP182	IP183	IP184	IP185	IP186	IP187	IP188	IP189	IP190
		IP191	IP192	IP193	IP194	IP195	IP196	IP197	IP198	IP200	IP201
		IP202	IP203	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K8	K9
		K10	K11	K22	K23	K24	K25	K26	K27	K28	K29
K30	K31	K32	K33	K34	K12	K13	K17	K18	K19	K20	K21



Şekil 13. IL-6 standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L)

Tablo 14. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflatuvar TNF- α konsantrasyon değerleri (ng/L)

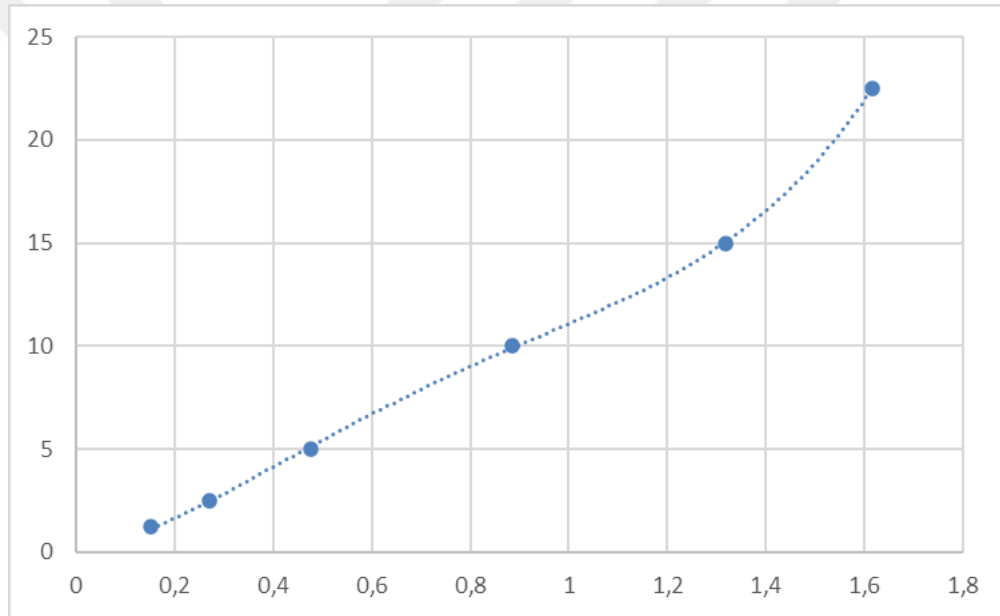
		223,7	204,4	180,7	337,8	368,1	577,4	641,4	469	362	372,7
Konsantrasyon ng/L		472,1	343,9	802,6	1196	435,2	356	380,3	369,6	442,9	413,8
		283,5	319,7	306,1	2871	336,3	334,8	328,7	427,6	407,7	2003
		351,4	252,1	325,7	710,7	398,6	195,5	255,1	237,2	241,6	672,8
		1877	495,2	436,8	205,9	426	569,6	400,1	705,9	748,6	438,3
		693,3	377,2	622,6	3528	2815	1895	456,7	394	371,2	914,7
		504,5	472,1	544,7	479,8	462,9	657,1	1281	509,1	495,2	577,4
693,3	1672	384,8	0	510,6	652,4	513,7	2768	1563	3433	2050	459,8
		IP151	IP152	IP153	IP154	IP155	IP156	IP157	IP158	IP159	IP160
Örnek Kodları		IP161	IP162	IP163	IP164	IP165	IP166	IP167	IP168	IP169	IP170
		IP171	IP172	IP173	IP174	IP175	IP176	IP177	IP178	IP179	IP180
		IP181	IP182	IP183	IP184	IP185	IP186	IP187	IP188	IP189	IP190
		IP191	IP192	IP193	IP194	IP195	IP196	IP197	IP198	IP200	IP201
		IP202	IP203	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K8	K9
		K10	K11	K22	K23	K24	K25	K26	K27	K28	K29
K30	K31	K32	K33	K34	K12	K13	K17	K18	K19	K20	K21



Şekil 14. TNF- α standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L)

Tablo 15. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki proinflamatuvar IL-1 β konsantrasyon değerleri (ng/L)

		16,79	19,91	17,24	17,57	24,11	35,47	29,11	14,94	13,87	16,47
Konsantrasyon ng/L		15,45	11,95	21,95	44,13	19,91	12,99	14,75	18,54	10,33	12,99
		16,6	14,12	18,15	136,8	13,93	14,24	13,99	12,87	15,06	65,1
		19,19	12,69	18,61	37,85	13,99	11,35	14,12	9,92	12,99	24,89
		112,1	21,88	20,11	16,21	14,81	19,39	17,18	37,26	27,3	17,11
		44,4	17,5	23,85	386	262,2	77,6	17,76	12,93	17,89	51,31
		14,24	19,98	11,65	17,57	14,05	27,75	47,64	12,87	15,7	20,11
34,13	54,52	18,74	23,26	23,45	31,08	26,52	120,1	70,34	453,8	77,78	14,75
		IP151	IP152	IP153	IP154	IP155	IP156	IP157	IP158	IP159	IP160
Örnek Kodları		IP161	IP162	IP163	IP164	IP165	IP166	IP167	IP168	IP169	IP170
		IP171	IP172	IP173	IP174	IP175	IP176	IP177	IP178	IP179	IP180
		IP181	IP182	IP183	IP184	IP185	IP186	IP187	IP188	IP189	IP190
		IP191	IP192	IP193	IP194	IP195	IP196	IP197	IP198	IP200	IP201
		IP202	IP203	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K8	K9
		K10	K11	K22	K23	K24	K25	K26	K27	K28	K29
K30	K31	K32	K33	K34	K12	K13	K17	K18	K19	K20	K21



Şekil 15. IL-1 β standartlarının konsantrasyon değerleri (ng/L)

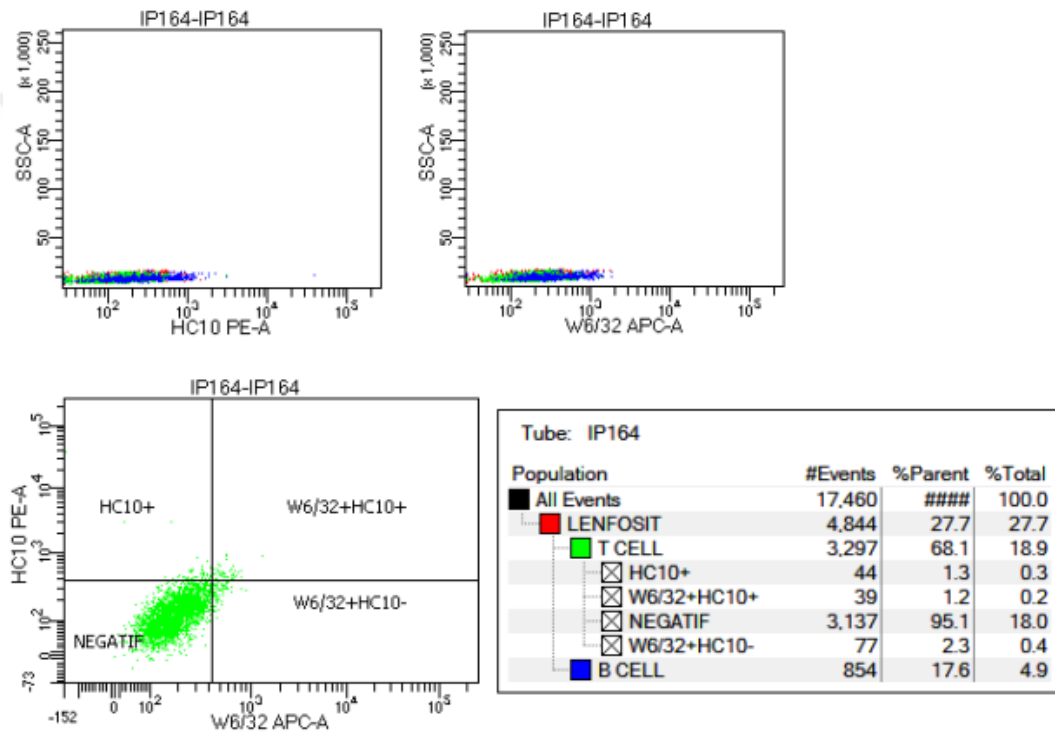
6.3. Akış Sitometrisi Sonuçları

Periferik kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücrelerde (PBMC) hatalı katlanma tayini yapılmıştır. 30 AS hastası ve 30 sağlıklı kontrol, T hücrelerine bağlanan CD3 antikoruna, monositlere bağlanan CD14 antikoruna, B hücrelerine bağlanan CD20 antikoruna, doğru katlanan proteinlere bağlanan W6/32 antikoruna ve hatalı katlanan proteinlere bağlanan HC10 antikoruna ile inkübe edilmiş olup, BD FACSDiva™ Software ile analiz edilmiştir. Sınıflandırma işlemi T hücrelerine göre yapılmıştır. Hasta ve kontrollere ait akış sitometrisi grafikleri Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmiştir.

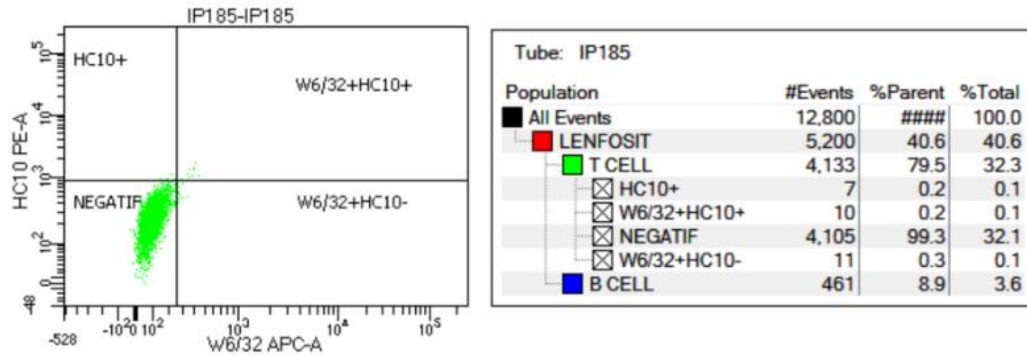
Tablo 16. Hasta ve sağlıklı kontrollerde tespit edilen lenfosit, T lenfosit, HC10 antikorlarının yüzdeleri

	Lenfosit (%)	T Lenfosit (%)	HC10+
KONTROL	14,79±6,38	60,24±7,02	0,3±0,220
HASTA	29,14±12,05	65,85±9,046	0,813±0,377

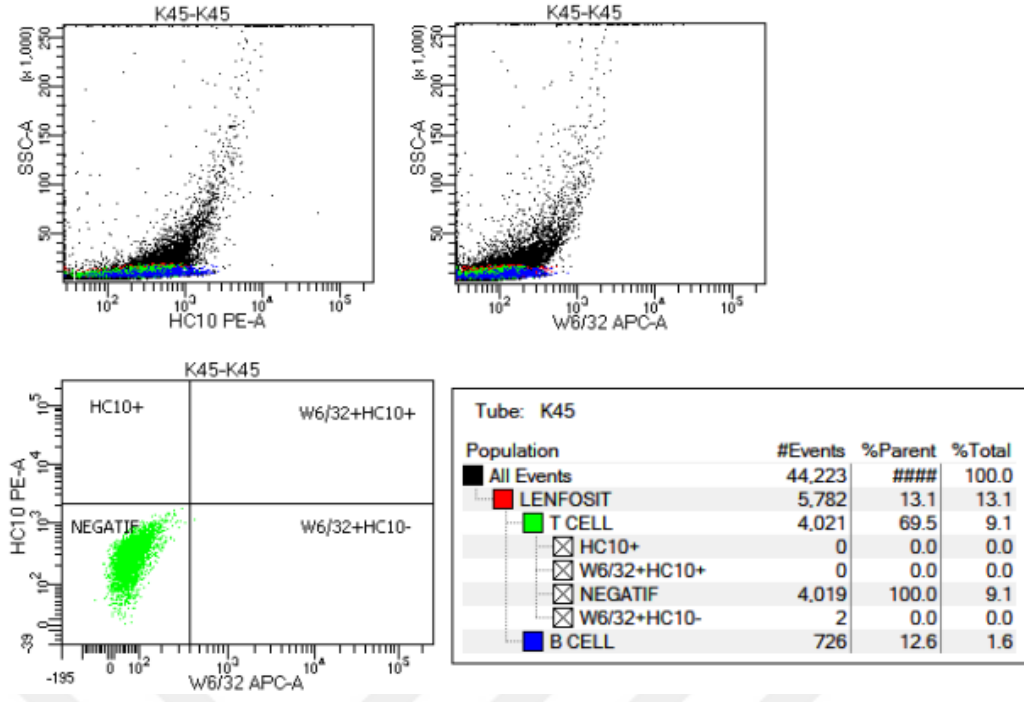
Hasta ve sağlıklı kontrollerde hatalı katlanan proteinlere bağlanan HC10 antikor değerleri AS hastalarında sağlıklı kontrollere göre artış göstermiş ($t= 6.1050$) ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.0001$) (Tablo 16). Bununla birlikte, HLA-B27 negatif hastalarda eser miktarda HC10 antikoru gözlenmiştir; fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 17).



Şekil 16. IP164 kodlu HLA-B27 pozitif hastaya ait akış sitometrisi grafipleri



Şekil 17. IP185 kodlu HLA-B27 negatif hastaya ait akış sitometrisi grafipleri



Şekil 18. K45 kodlu hastaya ait akış sitometrisi grafipleri

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ankilozan spondilit (AS), kronik ve enflamatuvar bir romatizmal hastalıktır. Genellikle omurgayı etkileyen bu hastalık, zamanla omurlar arasındaki eklemleri sertleştirebilir ve kaynaştırabilir. AS genellikle genç yetişkinleri ve erkekleri daha sık etkiler, ancak her yaş ve cinsiyetten kişiyi etkileyebilir. AS'nin belirtileri arasında sırtta ve belde ağrı, sabahları sertlik, hareket kısıtlılığı, şişlik ve üveit bulunabilir.

AS tedavisinde amaç, ağrıyı azaltmak, iltihabı kontrol altında tutmak ve hastanın hareket kabiliyetini sürdürmesini sağlamaktır. Fizik tedavi, egzersiz, anti-enflamatuvar ilaçlar ve biyolojik ilaçlar tedavi seçenekleri arasında yer alabilir. AS genellikle yavaş ilerler ve zaman içinde omurga üzerindeki etkiler artar. Erken teşhis ve etkili tedavi, hastalığın semptomlarını hafifletmeye yardımcı olabilir.

AS'nin tam nedeni bilinmemekle birlikte hastalığın patogenezi için çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bu hipotezlerden biri olan hatalı protein katlanması, *HLA-B27* genine bağlı olarak oluşan proteinlerin hatalı bir şekilde katlanmasının ve yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin iltihaplanmaya neden olabileceğini savunmaktadır. Bununla birlikte, AS'nin patogenezinin tam anlaşılması için devam eden araştırmalar ve klinik çalışmalar gereklidir. Bu teoriler, hastalığın temel mekanizmalarını açıklamak için öneriler sunmakla birlikte araştırmalar devam etmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER), hatalı veya yavaş katlanan proteinlerin neden olduğu stresi algılayarak katlanmamış protein yanıtını (UPR) başlatmaktadır. UPR, ATF6, IRE1 ve PERK transmembran proteinlerini aktive eder ve bu ER yerleşik proteinler aracılığıyla çeşitli transkripsiyon faktörlerinin üretimini, moleküler şaperonların indüksiyonunu, protein bozunmasının artışını ve apoptoz oluşumunu teşvik eder. ER stresi ayrıca NF- κ B yollarını aktive eder ve proinflamatuvar sitokinlerin, örneğin TNF α , IL-1 β , IL-6 gibi, salınımını uyararak inflamatuvar bir yanıtın oluşmasına neden olabilir. Bu mekanizmalar, hücre içindeki homeostazı korumak ve iltihaplanmayı düzenlemek için önemlidir.

Hatalı katlanan proteinlerin AS patogeneziindeki rolünü ortaya koymak amacıyla, AS hastaları ve sağlıklı kontrollerin T hücrelerindeki hatalı katlanan proteinlerinin tayini yapıldı ve AS hastalarında hatalı katlanan protein miktarını istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu sonuç literatürde yapılmış olan diğer çalışmalara benzer niteliktedir.

Colbert ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kronik inflamasyon bulunan AS hastalarında, HC10 antikoru tarafından tanınan yanlış katlanmış HLA-B ağır zincirleri belirgin

bir şekilde görülmüş olup sağlıklı kontrol grubu ve Crohn hastalığı taşıyan bireylerden oluşan grupta hatalı katlanan protein gözlenmemiştir (Colbert, R.A., ve ark., 2014).

Wang ve arkadaşlarının AS hastalarında IL-17 ve IL-23 ekspresyonunu ve IL-23'ün IL-17 üretimi üzerindeki etkisini inceledikleri bir çalışmada, serum IL-17 ve IL-23 seviyelerinin AS hastalarında anlamlı şekilde yüksek olduğunu belirlenmiştir (Wang, X., ve ark.,2009). Bizim çalışmamızda, IL-17 sitokin seviyesi hastaların çoğunluğunda yüksek olmasına rağmen, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermedi. Bununla birlikte, IL-6 ve IL-1 β seviyelerinde iki grup arasında anlamlı bir artış olmazken, TNF α seviyeleri AS hastalarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verdi.

HLA-B27 pozitif ve HLA-B27 negatif bireylerde görülen hastalığın oluşumunun ve gelişiminin aynı olup olmadığı anlaşılamamıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak, HLA-B27 (-) ve HLA-B27(+) hastalarda meydana gelen AS patogenezinde hatalı katlanmanın yerini araştırdık ve sağlıklı kontrollerle farklı parametreler ile karşılaştırılarak hastalık oluşumu ve gelişimi ile ilişkilendirdik. Elde edilen sonuçlar yapılan diğer çalışmalara paralel olarak, HLA-B27'nin yanlış katlanması, endoplazmik retikulum (ER) stresine ve katlanmamış protein yanıtının (UPR) aktivasyonuna yol açabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bu durum, hücre içindeki homeostazın bozulmasına ve inflamatuvar yanıtların tetiklenmesine neden olabilir. Yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, ER stresini artırabilir ve UPR'yi tetikleyebilir. Bu durum, inflamasyonla ilişkilendirilen sitokinlerin üretimini artırabilir. Özellikle IL-23 ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin artan üretimi, ankilozan spondilitin patogenezinde önemli bir rol oynayabilir. Verilerin daha net ve güvenilir bir şekilde anlaşılabilmesi için daha fazla hastanın dahil edildiği ileri prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu tür çalışmalar, ankilozan spondilitin patogenezinin, risk faktörlerini ve tedavi seçeneklerini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir. Aynı zamanda, bu çalışmaların daha geniş bir hasta popülasyonunu kapsamaları ve uzun vadeli takipler içermesi, hastalığın gelişimi, seyri ve tedavi yanıtları hakkında daha kapsamlı bilgiler sunabilir.

8. KAYNAKLAR

- Braun, J., & Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *Lancet*, 369, 1379-1390. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60635-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60635-7).
- Brewerton, D. A., Hart, F. D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D. C., & Sturrock, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*, 1(7809), 904-907. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)91360-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)91360-3).
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), 11-23. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2007.48.1.11>.
- Colbert, R. A., DeLay, M. L., Klenk, E. I. ve Layh-Schmitt, G. (2010). From HLA-B27 to spondyloarthritis: A journey through the ER. *Immunological Reviews*, 233(1), 181–202. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00865.x>.
- Colbert, R. A., Tran, T. M. ve Layh-Schmitt, G. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol*, 57(1), 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013>
- Çetinkaya, S. ve Dursun, H. G. (2016). Endoplazmik retikulum stresinde hücre sağkalım ve ölüm kararı. *Sakarya Tıp Dergisi*, 6(2), 0-0. <https://doi.org/10.5505/sakaryamedj.2016.03371>
- Diyarbakır, E. (2009). HLA-B27 Negatif Ankilozan Spondilit Ön Tanılı Hastalarda HLA Sınıf I Dağılımı [Yayınlanmamış yüksek lisans tezi]. Atatürk Üniversitesi.
- Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*. 2003 Mar;23(2):61-6. <https://doi.org/10.1007/s00296-002-0237-4>.
- Goodridge, J. P., Burian, A., Lee, N., & Geraghty, D. E. (2010). HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. *Journal of Immunology*, 184(11), 6199-6208. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000078>.
- Hanson, A. ve Brown, M. A. (2017). Genetics and the causes of ankylosing spondylitis. *Rheum Dis Clin North Am*. 43(3), 401-414. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2017.04.006>.
- Khan, M. A. (2013). Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Current Rheumatology Reports*, 15(10), 362. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0362-y>.
- Kirsten, B. ve Rik J. L. (2012). Insights into the pathophysiology of ankylosing spondylitis: Contributions from animal models. *Joint Bone Spine*, 79(3), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.09.008>
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40(2), 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.
- Kundu, M., & Thompson, C. B. (2008). Autophagy: Basic principles and relevance to disease. *Annual Review of Pathology*, 3, 427-455. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.091842>.

- Navallas, M., Ares, J., Beltrán, B., Lisbona, M. P., Maymó, J., & Solano, A. (2013). Sacroiliitis associated with axial spondyloarthritis: New concepts and latest trends. *Radiographics*, 33(4), 933-956. <https://doi.org/10.1148/rg.334125025>.
- Öztürk, Ö. G. (2011). *Büyük Doku Uyuşum Kompleksi*, 20(3), 159-167.
- Paladini, F., Fiorillo, M. T., Tedeschi, V., Cauli, A., Mathieu, A. ve Sorrentino, R. (2019). Ankylosing spondylitis: A trade off of HLA-B27, ERAP, and pathogen interconnections? Focus on Sardinia. *Front. Immunol*, 10, 35. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00035>
- Prakash, D., Prabhu, S. M., & Irodi, A. (2014). Seronegative spondyloarthritis-related sacroiliitis: CT, MRI features and differentials. *Indian Journal of Radiology and Imaging*, 24(3), 271-278. <https://doi.org/10.4103/0971-3026.137046>.
- Reveille, J. D. (2014). An update on the contribution of the MHC to AS susceptibility. *Clinical Rheumatology*, 33(6), 749-757. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2662-7>.
- Robert, A., Colbert, T. M., Tran, G. ve Layh, S. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Molecular Immunology*, 57(1), 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013>
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C. T., ... Sieper, J. (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(1), 25-31. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.133645>.
- Schittenhelm, R. B., Sian, T. C. C. L. K., Wilmann, P. G., Dudek, N. L. ve Purcell, A. W. (2015). Revisiting the arthritogenic peptide theory: Quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA-B27 allotypes. *Arthritis & Rheumatology*, 67(3), 702–713. <https://doi.org/10.1002/art.38963>.
- Sharip, A. ve Kunz, J. (2020). Understanding the pathogenesis of spondyloarthritis. *Biomolecules*, 10(10),1461. <https://doi.org/10.3390/biom10101461>.
- Tam, L. S., Gu, J., & Yu, D. (2010). Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(7), 399-405. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.79>.
- Taurog, J. D., Chhabra, A., & Colbert, R. A. (2016). Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *New England Journal of Medicine*, 374(26), 2563-2574. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406182>.
- The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC)., the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2)., Evans, D. et al. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 43, 761–767. <https://doi.org/10.1038/ng.873>
- Tsui, F. W., Tsui, H. W., Akram, A., Haroon, N., & Inman, R. D. (2014). The genetic basis of ankylosing spondylitis: New insights into disease pathogenesis. *Applied Clinical Genetics*, 7, 105-115. <https://doi.org/10.2147/TACG.S37325>.
- van der Linden, S. M., Valkenburg, H. A., de Jongh, B. M., & Cats, A. (1984). The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: A comparison of

relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis & Rheumatism*, 27(3), 241-249. <https://doi.org/10.1002/art.1780270301>.

Wang, X., Lin, Z., Wei, Q., Jiang, Y., & Gu, J. (2009). Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatology International*, 29(11), 1343-1347. <https://doi.org/10.1007/s00296-009-0883-x>.

Weinreich, S. S., Hoebe-Hewryk, B., van der Horst, A. R., Boog, C. J., & Ivanyi, P. (1997). The role of MHC class I heterodimer expression in mouse ankylosing enthesopathy. *Immunogenetics*, 46(1), 35-40. <https://doi.org/10.1007/s002510050239>.

Yazar, M. ve Sari-Kaplan, G. (2016). The relation between ER stress and HLA-B27 misfolding. *Med Res Innov*, 1. <https://doi.org/10.15761/MRI.1000111>

Zhu, W., He, X., Cheng, K., Zhang, L., Chen, D., Wang, X., ... Weng, X. (2019). Ankylosing spondylitis: Etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Research*, 7, 22. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0057-8>



