TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPONDİLOARTROPATİLERİN GENETİK VE EPİGENETİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ: ANKİLOZAN SPONDİLİTTE EPİGENETİK MODİFİYE EDİCİLERİN EKSPRESYONU

ŞEYMA ÇOLAKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Can ERZİK

İstanbul – 2015

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi	: Şeyma ÇOLAKOĞLU
Tez Başlığı	: Spondiloartropatilerin Genetik ve Epigenetik Yaklaşımla İncelenmesi: Ankilozan Spondilitte Epigenetik Modifiye Edicilerin Ekspresyonu
Sınav Yeri	: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 18.12.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Yrd. Doç. Dr. Can ERZİK	M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Ayşe ÖZER	M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	
Prof. Dr. Pamir ATAGÜNDÜZ	M.Ü. Tıp Fak. İç Hastalıkları AD	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 14./01./2016 tarih ve 31. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

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

Seyma Golakoğlu

I.TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam süresince bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Can Erzik'e,

Paylaştığı bilgi birikimi ve deneyimleriyle, eğitimim boyunca bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

MÜTF Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof Dr. Pamir Atagündüz'e, Uzman Dr. Gülsen Özen'e ve Dr. Rabia Deniz'e

Değerli bilgilerinden istifade ettiğim, bana her alanda destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. Mustafa Akkiprik, Yrd. Doç. Dr. İlter Güney ve Yrd. Doç. Dr. Fatih Eren'e,

Tez çalışmamdaki emekleri, manevi destekleri ve dostluklarından ötürü çok sevdiğim arkadaşlarım İrem Peker'e, Gökçe Güllü'ye, Pınar Gültepe'ye, Gözde Girgin'e ve Sezin Gürkan'a,

Tez çalışmam sürecinde gösterdikleri yardımlarından ötürü Çiğdem Albayrak'a, Serap Sevil Şahin'e, Enise Çavuşoğlu'na,

Tez çalışmam sırasında manevi desteklerini benden esirgemeyen Zennube Ezgi Kaya, Safiye Aracı, Ümit Özkaya'ya,

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerinden istifade ettiğim ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ergül Berber, Yrd. Doç. Özlem Yalçın Çapan, Yrd. Doç. Şirin Korulu Koç, Yrd. Doç. Barış Binay ve güzel şakalarıyla deneylerimizi güzelleştiren Oğuzhan Fatih Baltacı'ya,

Hayatımın her döneminde sevgi ve desteklerini hissettiğim, bu zorlu yolda daima beni cesaretlendirerek güvenle ayakta durmamı sağlayan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım annem ve kardeşlerime,

Şu anda bedeni hayatta olmasa da ruhuyla başarılarımı takip ettiğine inandığım, hayatımın her döneminde en büyük destekçilerimden biri olan sol yanım canım babacığıma,

TEŞEKKÜR EDERİM.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından ''SAG-C-YLP-110315-0056''numaralı proje ile desteklenmişti

II. İÇİNDEKİLER

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

µl: Mikrolitre

ANTXR2: Anthrox Toxin Reseptör 2

AS: Ankilozan Spondilit

ASAS: Assessment in Spondyloarthritis International Society

ATP: Adenozin Trifosfat

BMP: Bone Morfojenik Protein

cDNA: Tamamlayıcı DNA

Cp: Crossing Point

Ct: Cycle Threshold

dH2O: Distile Su

DKK-1: Dickkopf-Related Protein 1

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DNMT: DNA Metiltransferaz

dNTP: Deoksinükleotit

DTT: Dithiothreitol

EBH: Enflamatuvar Barsak Hastalığı

ERAP1: Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz 1

EtOH: Etil Alkol

g: Gravity / Yerçekimi

GAPDH: Gliseraldehit 3 Fosfat

HADC: Histon Deasetilaz

HAT: Histon Asetiltrasnferaz

HCI: Hidroklorik Asit

HLA-B27: İnsan Lökosit Antijen B-27

IFN-γ: İnterferon γ

IL12B: İnterlökin 12B

IL1R2: İnterlökin 1 Reseptör 2

IL23R: İnterlökin 23 Reseptör

KCI: Potasyum Klorür

LPS: Lipopolisakkarit

MgCl2: Magnezyum Klorid

MHC: Major Histocompatibility Kompleks

miRNA: Mikro RNA

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mRNA: Haberci RNA

MSASSS: Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score

ng: Nanogram

NK: Natural Killer

PBS: Fosfat Buffer Solüsyonu

Pmol: Pikomol

PsA: Psoriyatik Artirit

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RA: Romatoid Artirit

RASSS: Radiographic Ankylosing Spondylitis SpineScore

ReA: Reaktif Artirit

RF: Romatoid Faktör

RISC: RNA Interfering Silencing Bileşkesi

RNA: Ribonükleik Asit

RUNX3: Run Related Transkripsiyon Faktör 3

SAM: S adenosyl L Methionine

SLE: Sistemik Lupus Eritamatozus

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizm

SpA: Spondiloartropati

TASC: Wellcome Trust Case Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium

TGF-β: Transforming Growth Factor Beta

Th17: T Helper 17

TNFRSF1A: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A

TNF-α: Tümör Nekrosis Faktör Alfa

Wnt: Wingless-Type Like

IV: ŞEKİL TABLO VE GRAFİKLER LİSTESİ

i. Şekiller Listesi

ii. Tablolar Listesi

1. ÖZET

Spondiloartropati (SpA) hastalık grubunda yer alan Ankilozan spondilit (AS); başlıca enflamatuvar sırt ağrısı, asimetrik periferal oligoartrit, entezit ile tanımlanmış, diğer çok etkenli hastalıklar gibi, ortaya çıkışı genetik ve çevresel etkenlerle tetiklenen romatizmal otoimmün bir hastalıktır. Geçtiğimiz yıllar içinde insan ve diğer organizma genomlarının dizilenmesiyle varyasyonların incelenmesi, birçok hastalıkta olduğu gibi, AS hastalığının da genetik temelinin anlaşılması konusunda anlamlı mesafe kaydedilmesine imkan sağlamıştır.

Genetik temelin yanı sıra epigenetik değişikliklerin de fizyolojik süreçlerde olduğu kadar, hastalık gelişiminde de önemli olduğu bilinmektedir. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Başlıca epigenetik değişiklikler; DNA metillenmesi, histon ve kromatin yapı değişiklikleri ve kodlamayan RNA havuzundan oluşur. Yapılan çalışmalarda, epigenetik özellikleri etkileyen moleküllerin ifade edilmesinde ortaya çıkan değişikliklerin artirit gelişimi ve romatoid artiritin patogeneziyle ilişkisi olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada AS tanısı almış diskordant monozigotik ikizler ile hastalığın radyolojik skorlamasına göre ağır ve hafif grup olarak klinikte tanımlanan iki gruba dahil edilmiş hastalarda epigenetik yapıyı düzenleyen (DNA metilaz, histon metilaz, kromatin şekillendiriciler gibi) genlerin ekspresyonları analiz edilmiştir. Analiz sonucunda NEK6, PRMT6, KDM6B, AURKA, CARM1, SETD1B, SETDB1, PRMT1, DNMT1, PRMT3, SETD7, MBD3, HDAC1, KDM4A, MLL, SUV420H1, NCOA3, KAT2B, SMYD3, RPS6KA5 genlerinin ekspresyonlarında görünen gruplar arası farklılık, anılan genlerin daha yüksek sayıda hasta gruplarında ekspresyon açısıdan incelenerek, doğrulanması gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Spondiloartropati , Ankilozan Spondilit, Epigenetik, Epigenetik Modifiye Edici

2. SUMMARY

Ankylosing spondylitis (AS), which is a member of multifactorial autoinflammatory Spondyloarthropathies, is defined by inflammatory dorsal pain, asymmetric peripheral oligoarthritis, enthesitis.

The analysis of variations by DNA sequencing in human and other organisms has enabled a significant progress in understanding of the genetic basis of AS and many other diseases.

Beside genetical basic, epigenetic changes are also considered as important tools for physiological processes and disease development. Major epigenetic changes can be classified as DNA methylation, histone modifications, chromatin remodelling and non-coding RNA effects. Studies so far are indicating that expression changes of molecules involved in epigenetic modifications might have a role in development of arthritis and pathogenesis of rheumatoid arthritis.

In this study the expression of so called "epigenetic modifiers" like DNA methylase, histon methylase, chromatin remodeller complex has been analysed in a discordant monozygotic twin couple for AS and AS patients that have been classified as "fast progressing" and slow progressing according to radiographic scoring. The differential expression in NEK6, PRMT6, KDM6B, AURKA, CARM1, SETD1B, SETDB1, PRMT1, DNMT1, PRMT3, SETD7, MBD3, HDAC1, KDM4A, MLL, SUV420H1, NCOA3, KAT2B, SMYD3, RPS6KA5 genes should be validated in the same patient groups with larger number of subjects.

Key Words: Spondyloarthropathy, Ankylosing Spondylitis, Epigenetic, Epigenetic Modifier

3. GİRİŞ ve AMAÇ:

Spondiloartropatiler (SpAs); ankilozan spondilit (AS), enflamatuvar barsak hastalığı (EBH), reaktif artirit (ReA), andiferansiye spondiloartropati, juvenil spondiloartropati ve psoriyatik artrit (PsA)'den oluşan ağırlıklı olarak aksiyal iskeleti etkileyen kronik enflamatuvar hastalık grubudur (D. Prakash ve ark., 2014; M. Navallas ve ark., 2013).

SpA hastalık grubunda yer alan ve erkeklerde kadınlardan daha sık oranda görülen AS; sakroileit, omurgada enflamasyon ve hareket kaybına neden olan eklem iltihabı ile karakterize bir hastalıktır (ZQ. Zhu ve ark., 2013; E. Feldtkeller ve ark., 2007).

Nedeni tam olarak bilinemeyen hastalık için çevresel ve genetik faktörlerin birlikte katkı sağladığı düşünülmektedir (FW. Tsui ve ark., 2014). Hastalıkla ilişkisi tanımlanmış ilk gen Major Histocompatibility Complex (MHC) Class 1 molekülü olan HLA-B27'dir (S. van der Linden ve ark., 1983). AS hastalarının %90'nında HLA-B27 pozitiftir (D. Prakash ve ark., 2014; M. Navallas ve ark., 2013). Yüzden fazla alt türü rapor edilen (http://hla.alleles.org/proteins/class1.html Erişim tarihi: 15 Nisan 2015) HLA-B27'nin farklı alt türleri farklı populasyonlarda AS ile ilişkilendirilmiştir (MA. Brown ve ark., 2002; J. Martinez-Borra ve ark., 2000). B*2707 alt türünün Hintli ve Taylandlı hasta populasyonunda AS ile ilişkili olduğu, B*2704 alt türünün Taylandlı hastalarda AS ile yüksek bağlantısı olduğu bildirilmiştir (C.López-Larrea ve ark., 1995).

AS ile ilişkili MHC dışı genleri tanımlamak için yapılan 2 büyük çalışma sonucu ERAP1, IL23R, ANTXR2 ve IL1R2 genlerinin de hastalıkla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Wellcome Trust Case Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), 2007; Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010). Yeni lokusların saptanmasını olanak sağlayan Genom boyu bağlantı çalışmaları sonucunda da AS ile ilişkili birçok gen tespit edilmiştir (FW. Tsui ve ark., 2014).

Epigenetik, DNA dizi değişikliklerinden (genotip) bağımsız olarak kalıtılabilirliği olan gen ekspresyonundaki (fenotip) değişiklikler olarak tanımlanır (P. Gallipoli ve ark., 2015). Epigenetik değişiklikler kalıtılabilir olmalarına rağmen geri döndürülebilir değişikliklerdir. Memelilerde tanımlanmış başlıca epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histonlarda translasyon sonrası değişiklikler ve kromatin yapı değişimleri ve kodlanmayan RNA'ların etkisiyle oluşur (JP. Hamilton, 2011).

DNA Metiltransferazlar tarafından katalizlenen (JK. Kim ve ark., 2009) DNA metilasyonu, bir DNA dizisindeki sitozin nükleotidinin 5' karbonuna metil grubunun kovalent olarak bağlamasıyla meydana gelir (J. Newell-Price ve ark., 2000). Gen regülasyonunda önemli görevleri olan DNA metilasyonunun seviyesindeki düşüş (hipometilasyon) ya da artış (hipermetilasyon) çeşitli patolojik olaylarla sonuçlanmaktadır (E. Carrió & M.Suelves, 2015; JK. Kim ve ark., 2009) Otoimmün enflamatuvar bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozus (SLE) için diskordant olan monozigotik ikizlerle yapılan bir çalışmada, hasta ve sağlıklı kardeşler karşılaştırılmış ve hastalık patogeneziyle ilişkili olduğu düşünülen 49 genin hasta olan ikizlerde hipometile olduğu rapor edilmiştir (BM. Javierre ve ark., 2010).

Ökaryotlarda DNA çekirdekte kromatin olarak paketlenmiş halde bulunur. Kromatinin basit yapı birimi nükleozom 147 baz uzunluğundaki DNA'nın sardığı H2A, H2B, H3 ve H4'ün oluşturduğu histon sekizlisinden (oktomer) meydana gelir. Hepsi modifikasyonların gerçekleşmesini sağlayan küresel C-terminal bölge ve N-terminal kuyruğa sahiptir (K. Luger ve ark., 1997; H. Wu ve ark., 2015; T. Kouzarides, 2007; H. Wu ve ark., 2015). Histonların post translasyonel modifikasyonları dinamik enzim aileleri tarafından düzenlenir. Histonların asetilasyonu, histon asetiltransferazlar (HATs), histonların deasetilasyonu histon deasetilazlar (HDACs) tarafından kontrol edilir (AJ. de Ruijter ve ark., 2003). Genlerin hiperasetilasyon (asetilasyon artışı) ve hipoasetilasyonunun (asetilasyon düşüşü) çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. AS hastalarıyla yapılan bir çalışmada, HDAC/HAT aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı rapor edilmiştir (E. Toussirot ve ark., 2013). PCR Array yöntemi kullanılarak yapılan bir

çalışmanın sonucunda Romatoid Artirit (RA) hastalarında, histon kinazlar, asetiltransferazlar, deasetilazlar, metiltransferazlar, demetilazlar ve protein degredasyon–promoting ubikitin ligazlar olmak üzere 14 adet genin ifadesinin anlamlı şekilde arttığı ya da azaldığı tespit edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013).

Gen düzenlenmesinde çeşitli roller üstlenen, boyutlarına göre kısa (olgun formları 20-200 nükleotit uzunluğunda) ve uzun (200 nükleotitten uzun ve 100 kilobaza kadar) kodlanmayan RNA'ların birçok patolojiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. En çok çalışılmış olan kısa (19-22 nükleotid uzunluğunda), endojen, tek zincirli olan miRNA'lardır (BP. Lewis ve ark., 2003; A. Duggirala ve ark., 2015). Romatoid artiritli hastalarda miR-24 and miR-125a-5p'nin ekspresyon seviyeleri sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuş ve bu miRNA'ların hastalık tanısında kullanılabileceği düşünülmüştür (K. Murata ve ark., 2013). AS'de ise miR-16, miR-221 ve let-7i'nin AS hastalarının T hücrelerinde sağlıklı kontrollere göre yüksek ekspresyonu tespit edilmiştir (NS. Lai ve ark., 2013).

Yapılan çalışmada, artrit gelişimi ve romatoid artiritin patogeneziyle ilişkisi olduğu rapor edilen epigenetik özellikleri değiştiren moleküllerin düzeylerindeki değişikliklerin Ankilozan Spondilit ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ilk basamağında Ankilozan Spondilit (AS) tanısı almış diskordant monozigotik ikizler ile hastalığın radyolojik progresyonuna göre ağır ve hafif olarak gruplanmış hastaların kan örneklerinde epigenetik özellikleri belirleyen moleküllerin haberci RNA (mRNA) düzeyleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ekspresyon farklılığı saptanmış olan genlerin daha büyük bir hasta grubunda çalışılarak hastalıkla ilişkisinin daha yakından ortaya konması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Spondiloartropati

Spondiloartropatiler (SpAs); enflamatuvar değişikliklerin çoğunlukla omurgayı, periferal eklemleri, tendon, ligament ve sakroiliyak eklemleri etkilediği romatizmal hastalıklar grubudur. Bu grup, ankilozan spondilit (AS), enflamatuvar barsak hastalığı (EBH), reaktif artirit (ReA), andiferansiye spondiloartropati, juvenil spondiloartropati ve psoriyatik artrit (PsA)'den oluşur. Spondiloartropatiler, SpA hastalarının bazılarında romatoid faktörün (RF) varlığının tespit edilmesine kadar ''seronegatif spondiloartropatiler'' olarak bilinmekteydiler. Bu tespitin ardından ''spondiloartropati'' olarak adlandırılmaya başlandılar. Genellikle genç bireylerde ortaya çıkar ve populasyonda 0,15–1,8% oranında görülür (I. Sudol-Szopinska & A. Urbanik, 2013). Prevalansı ilerleyen yaşla beraber artan RF ise, sağlıklı bireylerin %5 'inde bulunmasının yanı sıra, hepatit c, sistemik lupus eritamatozus (SLE) gibi hastalıklarda da bulunan, globulin G'nin yapısal Fc kısmına karşı oluşmuş antiglobülin antikorudur (Onat ve ark., 2014).

Enflamatuvar sırt ağrısı SpA grubunun tipik klinik özelliklerinin başında gelmekle beraber, sakroiliyak, vertebral ve periferal eklemler, tendon, ligament ya da eklem kapsüllerinde meydana gelen enflamatuvar lezyonlar grubun diğer klinik özelliklerindendir (I. Sudol-Szopinska & A. Urbanik, 2013; O. Akgul & S. Ozgecmen, 2011). Bunların yanında sedef hastalığı, enflamatuar barsak hastalığı ve akut anterior üvet de bu hastalık grubunda gözlemlenmektedir (RJ Lories ve ark., 2009).

SpA klinik özelliklerine göre 2 ana gruba ayrılmaktadır. Sakroiliyak ve vertebral eklemlerin içinde bulunduğu enflamatuvar sırt ağrısını da barındıran klinik özelliklerin görüldüğü durumlar aksiyal spondiloartropatiler, tendon, ligament ya da eklem kapsül bölgeleri ve periferal eklemlerde enflamasyonla ortaya çıkan durumlar ise periferal spondiloartropatiler olarak adladırılmıştır (I. Sudol-Szopinska & A. Urbanik, 2013). 2009 ve 2001 yıllarında ASAS (Assessment in Spondyloarthritis International Society) tarafından bu iki grup için çeşitli kriterler belirlenmiştir (M.

Rudwaleit ve ark., 2009,2011; R. van den Berg & DM. van der Heijde, 2010) (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1: Aksiyal spondiloartropatiler için ASAS kriterleri (M. Rudwaleit ve ark., 2009,2011).

<table>
<tr><td colspan="3">Klinik İncelemede Enflamatuvar Sırt Ağrısı
(Periferik eklem bulguları olsa da olmasa da 45 yaşından küçük bireylerde 3 ay ve ya daha uzun süreli bel ağrısı)</td></tr>
<tr><td>Görüntüleme çalışmalarında sakroileit*</td><td rowspan="3">ya da</td><td>HLA-B27 antijenin görülmesi</td></tr>
<tr><td>+</td><td>+</td></tr>
<tr><td>Spondiloartropatilerin klinik özeliklerinden en az bir tanesinin görülmesi**</td><td>Spondiloartropatilerin klinik özeliklerinden en az iki tanesinin görülmesi**</td></tr>
</table>

*Görüntüleme çalışmalarında sakroileit; MRI'da SpA ilişkili sakroilieti destekleyen aktif enflamatuvar lezyonlar ya da 1984 yılındaki modifiye New York kriterlerine göre belirlenen x-ray değişiklikleri

**SpA 'nın klinik özellikleri; Enflamatuvar bel ağrısı, artirit, entezit, üveit, daktilit, sedef hastalığı, Crohn hastalığı ya da ülseratif kolit, steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlara iyi yanıt, ailede SpA öyküsü, HLA-B27 antijen varlığı, artmış serum CRP seviyesi

Tablo 2: Periferal spondiloartropatiler için ASAS kriterleri (R. van den Berg & DM. van der Heijde, 2010).

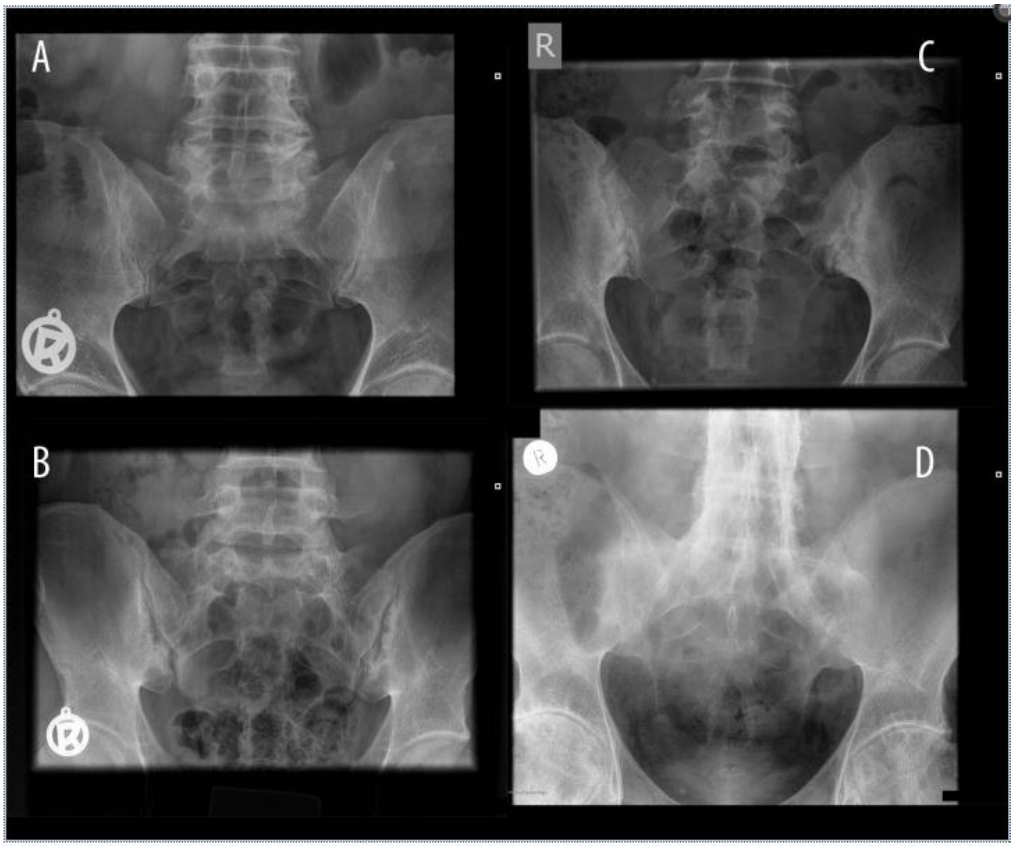
<table>
<tr><td colspan="2">Artirit (Genellikle alt bacak eklemlerinde simetrik olmayan artirit), entezit (tendon, bağ doku ve kapsüllerin enflamasyonu), daktilit (sosis şeklinde parmak) ile birlikte spondiloartropatilerin klinik özeliklerinden en az bir tanesinin görülmesi ve ya spondiloartropatilerin diğer klinik özeliklerinden en az iki tanesinin görülmesi</td></tr>
<tr><td>Spondiloartropatilerin klinik özeliklerinden en az bir tanesinin görülmesi</td><td>Spondiloartropatilerin diğer klinik özeliklerinden en az iki tanesinin görülmesi</td></tr>
<tr><td>Sedef Hastalığı</td><td>Artirit</td></tr>
</table>

Pozitif HLA-B27	Entezit
Üveitis	Daktilit sosis şeklinde parmaklar
MRI ve x-ray'de görüntülenen sakroileit	Enflamatuvar bel ağrısı
Crohn hastalığı ya da ülseratif kolit	Ailede SpA öyküsü
Artiritten önce gelen enfeksiyon	

Her iki grupta da sakroileit ortak klinik özelliktir. Özellikle ankilozan spondiliti de kapsayan (M. Dougados & D. Baeten, 2011) aksiyal SpA sakroileit ile başlamaktadır ve radyolojik olarak sınıflandırılarak (J. Braun ve ark., 2006) (Tablo 3) sakroiliyak eklemlerde görüntülenmiştir (M. Geijer ve ark., 2009; G. Huerta-Sil ve ark., 2006) (Şekil 1).

Tablo 3: Sakroileitin New York Kriterlerine göre radyolojik olarak sınıflandırılması (J. Braun ve ark., 2006).

Seviye 0: Değişiklik yok/ sakroiliyak eklemler normal
Seviye 1: Şüpheli değişiklikler
Seviye 2: Minimal değişiklikler
Seviye 3: İleri derece değişiklikler
Seviye 4: Ankiloz



Sacroilitis: (**A**) grade 1; (**B**) grade 2; (**C**) grade 3; (**D**) grade 4.

Şekil 1: Sakroileitin farklı seviyelerinin radyolojik görüntüsü (M. Geijer ve ark., 2009; G. Huerta-Sil ve ark., 2006).

Sakroiliyak eklemlerdeki enflamatuvar değişiklikler ASAS kriterlerine göre 2 grupta toplanmıştır (J.Sieper ve ark., 2009) (Tablo 4).

Tablo 4: ASAS kriterlerine göre sakroiliyak eklemlerdeki enflamatuvar değişiklikler (J.Sieper ve ark., 2009).

Aktif Enflamatuvar Lezyonlar	**Kronik Enflamatuvar Lezyonlar**
Kemik iliği ödemi	Kıkırdak altının sertleşmesi
Kapsül iltihabı	Erozyonlar
Sinovit	Yağ depolanması
Tendon, bağ doku ve kapsül bağlantılarında	Kemik köprüleri, ankiloz

enflamasyon	

Özellikle sakroiliyak eklemlerdeki radyolojik bulgular hastalıkların tanısı için önemini korumaktadır. Bunun yanında MR sonuçları ve X-ray taramalarıyla hastalardaki enflamatuvar lezyonlar değerlendirilmektedir (I. Sudol-Szopinska & A. Urbanik, 2013).

PsA'nın bazı formları gibi SpA grubundaki bazı hastalıklarda iskelet hasarları kemik ve eklem erozyonu sebebiyle meydana gelir. Buna karşı olarak AS'de eklem ve ya omurga ankilozu sebebiyle hastalarda kalıcı hareket kaybı, yeni kıkırdak ve kemik oluşumundan kaynaklanmaktadır (I. van Echteld, 2006).

4.2. Ankilozan Spondilit

SpA hastalık grubunda yer alan Ankilozan Spondilit (AS); enflamatuvar sırt ağrısı, asimetrik periferal oligoartrit, entezit ve sedef hastalığı, enflamatuar barsak hastalığı ve akut anterior üvet gibi spesifik organ tutulumunu içeren klinik özelliklere sahip olan yaygın kronik enflamatuvar ve otoimmün eklem hastalığıdır. Klinik olarak sakroileit, omurgada enflamasyon ve hareket kaybına neden olan eklem iltihabı ile karakterizedir. Kronik enflamasyon hücreler arasındaki bağ dokunun artmasına ve kemikleşmeye yol açar (A. Ebringer ve C. Wilson, 2000; ZQ. Zhu ve ark., 2013).

AS'nin görülme sıklığı erkeklerde kadınlardan daha fazladır (E. Feldtkeller ve ark., 2007; JD. Reveille & MH. Weisman, 2013) ve genel populasyonda görülme sıklığı % 0,1 ve % 1,4 arasında değişir. Yapılan çalışmalar farklı ülkelerde AS'nin görülme sıklığının her yıl 100.000 insanda 0,5-14 arasında değiştiğini rapor etmiştir (J. Braun ve J. Sieper, 2007). AS'nin teşhisinde laboratuvar testlerinden çok New York kriterlerinde belirtilen özellikler temel alınır (S. van der Linden ve ark., 1984) (Tablo 5).

Tablo 5: AS için 1984 New York kriterleri (S. van der Linden ve ark., 1984).

Klinik Kriterler
3 aydan uzun süren aşağı bel bölgesinde egzersiz ile düzelen ancak dinlenme ile rahatlamayan ağrı
Sagital ve frontal planda lomber omurganın hareketlerinde kısıtlanma
Normal olan yaş ve cinsyetle uyumlu kişilere göre göğüs genişlemesinde kısıtlanma
Radyolojik Kriter
Sakroileit seviye ≥2 ve ya tek taraflı seviye 3-4.

AS'nin ilk semptomları geç ergenlik ya da erken yetişkinlik (kadınlarda 30 yaş civarı, erkeklerde ortalama 26 yaş) dönemlerinde ortaya çıkar. Genellikle sinsi başlayan hafif ağrılar, başlangıç semptomudur. Ağrı genellikle bir kaç saat süren sabah tutukluğuyla beraber, kalça ya da bel bölgesinde başlar ve süreç içinde hastanın hareket etmesini güçleştirir. Ağrı bir kaç ay içinde kalıcı ve çift taraflı olur ve geceleri gittikçe kötüleşir (MR. Underwood &P. Dawes, 1995). Bazı hastalarda kemik hassasiyeti birincil şikayet olabilir ve bu duruma sırt ağrısı ve sertlik eşlik eder. Bazı hastalarda ise hastalığın erken aşamalarında kalça ve omuzlarda artirit meydana gelir. Diğer eklemlerdeki asimetrik artirit hastalığın herhangi bir aşamasından meydana gelirken, boyun ağrısı ve sertlik hastalığın ileriki aşamaları için karakteristiktir (J.Sieper ve ark., 2002).

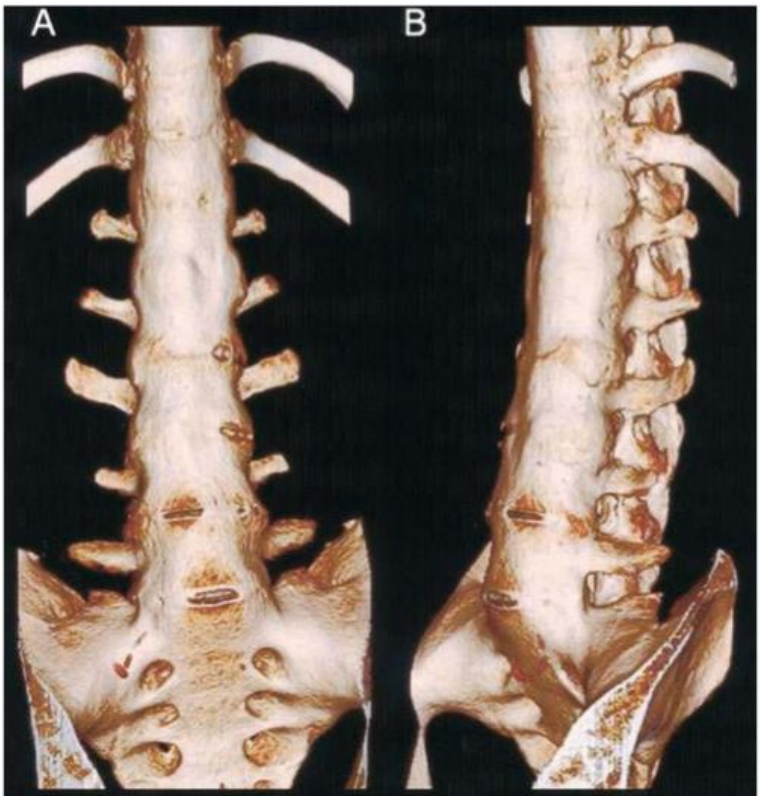
4.2.1. Ankilozan spondilitin fizyopatolojisi

AS'nin nedeni tam olarak bilinmemektedir ancak genetik ve çevresel faktörlerin her ikisinin de hastalığın patogenezinde önemli rollleri olduğu düşünülmektedir (E.B Gouveia ve ark., 2012). Özellikle hücresel süreçler immün bağlantılı AS patogenezine katkıda bulunmaktadır. Spesifik immün hücre tiplerinin (T hücreleri)

AS hastalarınının kıkırdaklarındaki enflamatuvar cevaptan sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Hastalıkta görülen kronik enflamasyonun ise kemikleşmeye yol açtığı rapor edilmiştir (A. Ebringer ve C. Wilson, 2000; ZQ. Zhu ve ark., 2013; C. Wang ve ark., 2015). Tüm bu bileşenler, özellikle enflamasyon-yeni kemik oluşumu/bozunumu sürecine katkıda bulunmaktadır.

Büyüme ve gelişme sırasındaki kemik oluşumu çok sayıda moleküler mekanizmayı ve onların birbirleriyle etkileşimini kapsar. Çalışmalar kıkırdak ve kemik patolojisinde özellikle de yeni kemik oluşumunda benzer yolakların ve işleyişlerin rol aldığını desteklemektedir. Bu yolaklar bone morfojenik protein (BMP), *wingless-type like* (WNT), hedgehog, fibroblast büyüme faktörleri, notch ve paratiroid benzeri peptid sinyallerini kapsamaktadır (RJ Lories ve ark., 2009).

Ankilozan spondilitte kendisi gibi enflamatuvar romatolojik bir hastalık olan ancak küçük ve orta büyüklükteki eklemlerde simetrik ve aşındırıcı artiritle karakterize olan romatoid artiritten farklı olarak (DL. Scott ve ark., 2010), hem enflamatuvar aşındırıcı osteopeni hem de kemiklerde beklenmeyen yeni kemik oluşumu gözlenmektedir. Bazı hastalarda omurgada kemiklerin birleşerek oluşturduğu bir form olan ‘’bambu kamışı’’ görülmektedir (A. Boonen & JL. Severens, 2002; JH. Ju ve ark., 2007) (Şekil 2).



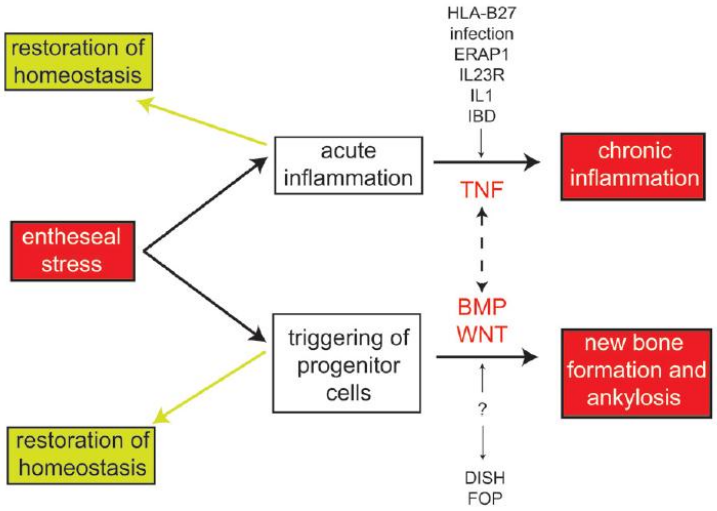
Şekil 2: 42 yaşında erkek AS hastasında görülen bambu kamışı (JH. Ju ve ark., 2007).

İnsan lökosit antijen (HLA)-B27 pozitif Tayvanlı hastalarda yapılan bir çalışmada farklı haplotiplerle bambu kamışı arasındaki ilişki incelenmiş ve A33-B58-Cw10, A33-B58-Cw10-DR13, A33-B58-Cw10-DR17 haplotiplerinin bambu kamışı arasında güçlü bağlantı olduğu tespit edilmiştir (MC. Lu ve ark., 2009).

Enflamasyon, kemik/kıkırdak bozulumu ve osteoproliferasyon SpA patogenezinin üç temel özelliğidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar hücresel ve moleküler süreçlerin içinde bulunduğu çeşitli teoriler geliştirmiştir (M. Dougados & D. Baeten, 2011). Bununla birlikte bu üç patolojik süreç arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. Bu durum için iki ana hipotez önerilmiştir.

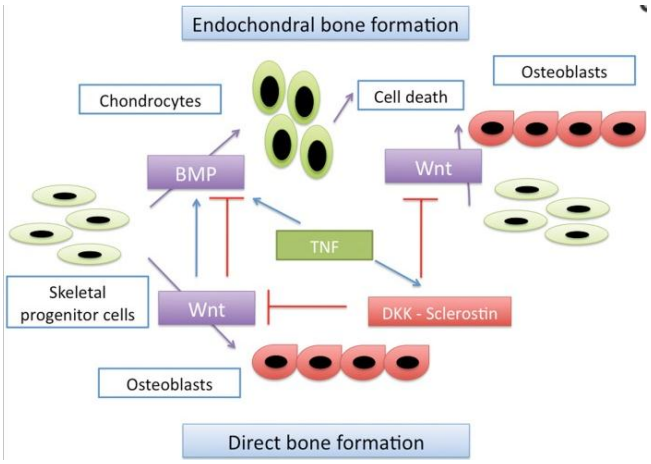
İlk hipoteze göre; enflamasyon başlangıçta kemik bozulumunu tetiklerken aynı anda yeni kemik oluşumunu baskılar. Sistemik enflamasyonu tetikleyen *Tumor necrosis factor* (TNF), Wnt sinyalini bloke ederek osteoblast fonksiyonunu baskılarken osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu promote eden merkezi role

sahiptir. İkinci hipoteze göre ise; bilinmeyen bir tetikleyici akut enflamatuvar reaksiyonu indüklemekte ve stromal hücrelerin aktivasyonunu sağlamaktadır (LM. van Duivenvoorde ve ark., 2012; RJ Lories ve ark., 2009)(Şekil 3).



Şekil 3: SpA'da enflamasyon ve ankiloz arasındaki ilişki (RJ Lories ve ark., 2009).

AS'de yeni kemik oluşumu hem kıkırdak içi hem de doğrudan kemik oluşumu şeklinde görülmektedir. Doğrudan kemik oluşumunda öncül hücreler osteoblastlara farklılaşmaktadır. Bunun yanında farklılaşma, proliferasyon gibi görevleri olan *transforming growth factor beta* (TGF-β) protein ailesine üye olan ve noggin, chordin gibi antagonistleri olan BMP'ler kıkırdak içi kemik oluşumunda temel rol oynamaktadırlar. Wnt'ler bu süreci spesifik ligandlara ya da konsantrasyona bağlı olarak uyarır ya da engeller. Wnt antagonistleri; Dickkopf-related protein 1 (DKK-1) ve sklerostin düzenleyici olarak görev yapar. TNF gibi proenflamatuvar sitokinler hem BMP'leri hem de Wnt antagonistlerinin düzenlenmesinde görevlidir (S.Carter ve ark., 2012; K. Chandramore & S. Ghaskadbi, 2011) (Şekil 4).



Şekil 4: Ankilozan Spondilitte kıkırdak içi ve direk yeni kemik oluşumu (S.Carter ve ark., 2012).

AS'de bu mekanizmaların anlaşılabilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Wnt sinyal yolağının antogonisti ve protein kinaz olan DKK 1 ile yapılan bir çalışmada, DKK 1 'in inhibisyonunun TNF transgenik farelerde artiriti uyardığı ve bu nedenle DKK 1'in bu mekanizmada anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir (D. Diarra ve ark., 2007). Artrit için spontan ve entezitle karakterize olan model olan DBA/1 farelerde yapılan bir çalışmada ise BMP antogonisti NOG gen transferinin, spontan artrit başlangıcını ve ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir. NOG gen terapisi yapılan grupla tedavi yapılmayan kontrol grubu karşılaştırıldığında tedavinin, hastalığının ilerlemesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (RJ. Lories ve ark., 2005).

AS hastalarınının kıkırdaklarındaki enflamatuvar cevaptan sorumlu olduğu düşünülen immün hücrelerde meydana gelen çeşitli değişimler AS'nin sistemik immün bağlantılı bir hastalık olduğunu destekler niteliktedir. Özellikle hastalarda T hücre alt tipleri olan CD4+ and CD8+ hücrelerinin kanda ve sinoval sıvıda biriktiği kanıtlanmıştır. Bunun yanında enflamasyon belirteci olan *Tumour Necrosis Factor-α* (TNF-α)'nın sakroiliyak eklemlerde birikmesi AS patogenezinde önemli rollere sahip olduklarını kanıtlar niteliktedir. CD4+ T hücreleri, IL-17-ürünü T hücreleri ve *T helper 17* (Th17) hücrelerinin AS hastalarının sinoviyal sıvılarında tespit edilmesi T

hücrelerinin lokal enflamasyon sürecinde rol aldığı anlamına gelmektedir (C. Wang ve ark., 2015). Bunlarla beraber HLA-B27, İnterlökin 23 Reseptör **(**IL-23R) ve Endoplazmik Retikulum Aminopeptidaz-1 (ERAP-1) genlerindeki polimorfizmlerinin de AS patogenezindeki immün mekanizmaya katkı sağladığı rapor edilmiştir (PB. Wright ve ark., 2015).

Belirtildiği üzere AS'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedir ancak özellikle hastalık/HLA-B27/immün sistem arasında büyük bağlantı olduğu belirtilmiştir.

İnsan lökosit antijen (HLA)-B27 6. kromozomun kısa kolundan kodlanan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *Class 1* molekülüdür. Bir çok hücre tipinde bulunur ve antijen sunan hücrelerde ekspresyonu yüksektir (L. Schlosstein ve ark., 1973). HLA-B27 hastalıkla ilişkisi tanımlanmış ilk gendir ve AS hastalarının %80'i pozitiftir. Ancak bunun yanında B27 pozitif bireylerin yalnızca %1-%5'inde AS görülür. Yapılan bazı çalışmalar B27 pozitif AS hastaların akrabalarında hastalığın görülme olasılığının genel populasyona göre 5,6-16 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (A. Calin ve ark., 1983; S. van der Linden ve ark., 1983; MA. Khan, 2002).

HLA-B27'nin AS ile ilişkisini tanımlayabilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Beyaz ırkta yapılan bazı çalışmalarda AS hastası bireylerin %90'nından fazlasında HLA-B27'nin pozitif olduğu ancak bununla beraber çoğu pozitif bireyin sağlıklı kaldığı görülmüştür. Bu durum başka genlerin de AS ile ilişkili olabileceği düşüncesini ortaya koymuştur (SM. van der Linden ve ark., 1984; MA. Brown ve ark., 1996; JD.Reveille, 2006).

Yüzden fazla alt türü rapor edilen (http://hla.alleles.org/proteins/class1.html Erişim tarihi: 15 Nisan 2015) HLA-B27'nin farklı alt türlerinin farklı populasyonlarda AS ile ilişkisini ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur. Çalışmalar devam ettikçe ortaya konan alt tür sayısı da hızlı bir şekilde artmaktadır (JD. Reveille ve ark., 2001; MA. Brown ve ark., 2002; J. Martinez-Borra ve ark., 2000) (Tablo 6). Örneğin 230 Koreli hastayla yapılan bir çalışmada; HLA-B27'nin AS ile yüksek oranda (%96,3) ilişkili olduğu, HLA-B27 pozitif bireylerde B*2705 (%92,2) ve

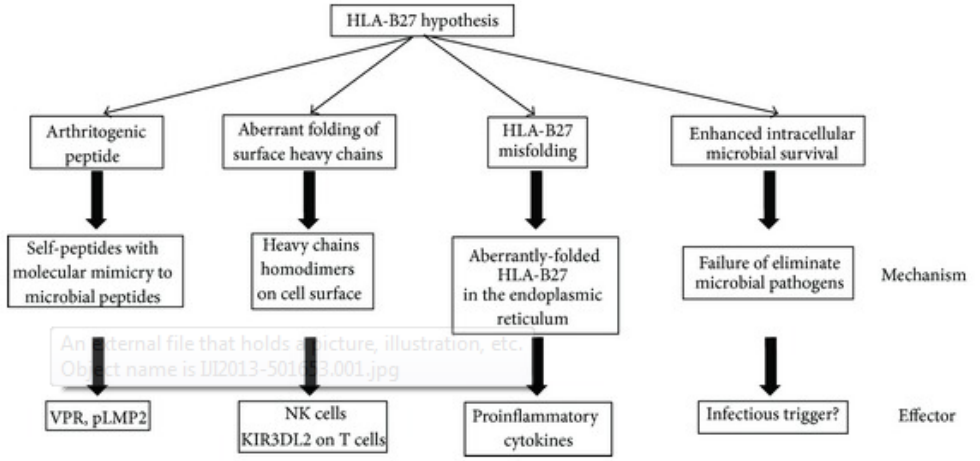
B*2704 (%5,8) alt türlerinin Koreli hastalar için başlıca alt türler olduğu belirtilmiştir (KS. Park ve ark., 2008). Asyalı hastalarla (Taylandlı ve Hint gruplar) yapılan başka bir çalışmada B*2707 alt türünün her iki populasyonda da AS ile ilişkili olduğu, B*2704 alt türünün Taylandlı hastalarda AS ile yüksek bağlantısı olduğu bildirilmiştir (C.López-Larrea ve ark., 1995).

Tablo 6: AS ilişkili HLA-B27 alt grupları ve etnik köken ilişkisi.

Alt Tür	**Hastalıkla Bağlantısı**	**Yaygınlık**	**Coğrafik Toplum**
B*2705	Var	Değişken	Tüm dünya
B*2702	Var	Değişken	Orta Doğu, Kuzey Afrikalı, Avrupalı Beyaz Irk
B*2703	Var	Sınırlı	Batı Afrikalı
B*2704	Var	Değişken	Çinli,Japon, Endonezyalı
B*2706	Yok	Değişken	Asyalı
B*2707	Var	Az	Hint, Çinli
B*2708	Var	Nadir	UK

HLA-B27'nin AS ile ilişkisi belirtilirken mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak AS'deki moleküler patojenik rolü hakkında çeşitli teoriler mevcuttur. Bu teorilerden ilki ve en baskın olan artirit oluşumuna sebep olan peptid teorisi, HLA-B27'nin mikrobiyal ya da artirit oluşumuna sebep olan self bir peptitle bağlanması esasına dayanır. HLA-B27 sınırlı sitotoksik T hücresinin, sadece eklemlerde ve diğer dokulardaki peptit veya peptitlere olan yanıtı hastalığa neden olabilir. Ancak bu peptitlerin AS patogenezine katkısını gösteren hiçbir kanıt

bulunamamıştır. HLA-B27 homodimerlerin hücre yüzey teorisine göre; HLA-B27'nin ağır zincirleri homodimer yapıdadır ve endoplazmik retikulumda bu homodimer yapısında bozulma meydana gelebilir. HLA-B27 pozitif bireylerde *natural killer* (NK) hücrelerin ve CD4+ T hücrelerinin artması bu teoriyi destekler nitelikte olsa da hastalıkla ilişkisi kesinleştirilememiştir. Bir diğer teoriye göre, HLA-B27'nin yanlış katlanması sonucu oluşan bozuk proteinin hücrede birikimi proenflamatuvar strese yol açıp hastalığın gelişmesine neden olabilir. Son teori ise; HLA-B27 pozitif bireylerin bazı hücre içi patojenleri ortadan kaldırmada yetersiz olması esasına dayanır. HLA-B27 taşıyıcılarının *Yersinia, Salmonella, Shigella* ve *Chlamydia* gibi hücre içi mikrobiyal türleri öldürmede yetersiz kaldığı ve bu durumun enfeksiyonu tetiklediği düşünülmektedir. Bu teori de henüz kanıtlanamamıştır (JF. Zambrano-Zaragoza ve ark., 2013) (Şekil 5).



Proposed theories to explain the molecular pathogenic role of HLA-B27 in AS.

Şekil 5: HLA-B27'nin AS'deki moleküler patojenik rolü üzerine teoriler (JF. Zambrano-Zaragoza ve ark., 2013).

4.2.1.1. Genetik faktörler

Genetik faktörler AS'nin gelişiminde tek belirleyici olmamasına rağmen büyük ölçüde ilişkilidir (S, Brophy ve ark., 2004). Patolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılan çalışmalar sonucunda hastalığın

büyük ölçüde kalıtsal olduğu ancak bununla beraber çevresel tetikleyicilerin de yaygın olabileceği belirtilmiştir (MA. Brown ve ark., 1997). Hastalığın >%95 kalıtsal olduğu tahmin edilmektedir. Örneğin AS'nin kardeşlerde nüks etme riski (%9,2) normal popülasyonla karşılaştırıldığında (%0,1) çok daha yüksektir. Hastalıkla ilişkisi tanımlanmış ilk gen olan İnsan lökosit antijen (HLA)-B27 pozitif ikizler karşılaştırıldığında monozigotik ikizlerdeki AS konkordans oranının (%63) B27 pozitif dizigotik ikizlerden (%27) çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer istatistiki değerlendirmeler AS'ye yatkınlığın büyük ölçüde kalıtsallığını düşündürmektedir (FW. Tsui ve ark., 2014).

4.2.1.1.1. MHC dışındaki genler ve AS

AS ile ilişkisi olan MHC dışı genleri tanımlayabilmek için iki anahtar çalışma mevcuttur. İlk çalışma 2007 yılında, 1,000 AS hastası ve 1,500 sağlıklı kontrol kullanılarak yapılmıştır. 14,436 benzer olmayan tek nükleotid polimorfizm (SNPs; proteinin amino asit dizisini değiştiren) genotiplemesi sonucunda ERAP1 ve IL23R genlerinin AS ile ilişkisi tanımlanmıştır (Wellcome Trust Case Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), 2007). İkincisi ise; AS için raporlanmış ilk genom boyu bağlantı çalışmasıdır. 2,053 akraba olmayan AS hastası ve 5,140 sağlıklı kontrolle yapılan çalışma sonucunda 2p15 ve 21q22 kromozom bölgelerinde yer alan ANTXR2 ve IL1R2 genlerinin AS ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010).

4.2.1.1.1.1. Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1 (ERAP1)

ERAP1 proteinin bilinen 3 biyolojik fonksiyonu mevcuttur. İlk olarak ERAP1, endoplazmik retikulumda MHC Class 1 moleküllerine bağlanacak antijenlerin optimal boy uzunluklarını düzenleyebilmek için moleküler cetvel görevi görür (L. Saveanu ve ark., 2005). İkinci görevi, lipopolisakkarit (LPS) ve interferon (IFN)-γ tarafından indüklenen makrofajların aktivasyonunda görev alır (Y.Goto ve ark., 2011). Son olarak, hücre yüzeyinde bulunan sitokin reseptörlerinin yıkımından sorumludur. Bu yıkım proteinlerin enflamasyon sürecini etkileyen hücre içi kimyasal

sinyallerinin azalmasına neden olur. ERAP1'de meydana gelen fonksiyon kaybı hücre yüzey reseptörlerinin hücredeki seviyelerinin artması ya da azalmasına yol açar ve AS'ye yatkınlık artar (N. Haroon ve ark., 2010).

ERAP1'in AS'ye katkısı tam olarak netleştirilememiştir. Ancak ERAP1 genindeki polimorfizmlerin AS ile ilişkisini anlayabilmek için genin fonksiyonel yapısı üzerine düşünülmüştür.

ERAP1'in AS ile ilişkisi 2007 yılında yapılan bir çalışma sonucunda aydınlatılmış (Wellcome Trust Case Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), 2007) bunun üzerine birçok SNP çalışması yapılarak AS ile ilişkisi ortaya konulmuştur (JF. Zambrano-Zaragoza ve ark., 2013) (Tablo 7).

Tablo 7: ERAP1 ve AS arasında bağlantı çalışmaları (JF. Zambrano-Zaragoza ve ark., 2013).

Toplum	Yıl	Çalışma Tipi	SNP	Bağlantı
UK	2007	Genom-boyu bağlantı çalışması	rs30187 rs27044	Risk
UK, Avusturalyalı, Kanadalı	2011	Genom-boyu bağlantı çalışması	rs30187	Risk
Kanadalı	2009	Vaka-kontrol	rs30187 rs26653	Risk
Portekizli	2009	Vaka-kontrol	rs27044	Risk
Macar	2010	Vaka-kontrol	rs27044	Risk
Koreli	2010	Vaka-kontrol	rs27044	Risk

			rs30187	
İranlı	2012	Vaka-kontrol	rs27434 rs30187	Risk
Asyalı, Avrupalı	2011	Meta-Analiz	rs27044 rs30187	Risk

4.2.1.1.1.2. İnterlökin 23 reseptör (IL23R)

IL23R *(interleukin-23 receptor)* geni 1. kromozomun kısa kolunda lokalizedir (C.Parham ve ark., 2002). IL23R geni T helper 17(Th17) hücrelerinin üretimi ve farklılaşma yolaklarıyla bağlantılı olmakla beraber makrofaj, mikroglia, natural killer hücreleri (NK) ve natural killer T hücreleri gibi immünolojik hücre tiplerinde ekprese olur (BS. McKenzie ve ark., 2006; C. Jandus ve ark., 2008). 2008 yılında AS hastalarının periferal kanlarıyla yapılan çalışmada, AS hastalarında sağlıklı kontrollere göre Th17 hücrelerinin sayısının artmış olduğu tespit edilmiştir (C. Jandus ve ark., 2008).

IL23R ve ligandı IL23, immün düzenleme yolaklarının başlıca bileşenleridir. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar IL23R geninde meydana gelen bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin Crohn's hastalığı gibi birçok otoimmün hastalıkla bağlantılı olduğunu göstermiştir (RH. Duerr ve ark., 2006).

IL23R geninde meydana gelen polimorfizmlerin AS ile ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wellcome Trust Case Control Consortium ve Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), 2007). Genom boyu bağlantı çalışmaları IL23R'deki rs11209026 ve rs11465817 varyantlarının AS ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010). 2013 yılında Çinli bireylerle yapılan başka bir çalışmada

HLA-B27 pozitif bireylerde IL23R'nin rs17375018 varyantının AS ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (H. Dong ve ark., 2013).

4.2.1.1.1.3. İnterlökin 1 reseptör 2 (IL-1R2)

İnsanlarda IL-1R2 *(interleukin 1 receptor-2)* geni 2. kromozomun uzun kolunda lokalize olur (NG. Copeland ve ark., 1991). IL-1R2 esas olarak miyeloid ve lenfoid hücrelerde eksprese olur ve 29 amino asit uzunluğunda kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir (A.Dunne & LA. O'Neill, 2003).

IL-1R2'nin enflamasyon, immünite ve özellikle enflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol oynayan proenflamatuvar bir sitokin olan IL-1 (interleukin 1) için yem (decoy) reseptörü olarak çalıştığı rapor edilmiştir (X. Cui ve ark., 2003).

IL-1R2'nin AS ile ilişkili olduğu ilk olarak 2010 yılında yayınlanmıştır (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010). Bu çalışmayı köken alan 490 AS hastası ve 580 sağlıklı kontrolle yapılan başka bir çalışma sonucunda IL-1R2 genindeki rs2302589 varyantının çalışma yapılan etnik grupta AS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Y. Xia ve ark., 2015).

4.2.1.1.1.4. Diğer genler

Anthrax toxin receptor 2 (ANTXR2), *runt-related transcription factor 3* (RUNX3), *interleukin-12B* (IL12B) ve *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A* (TNFRSF1A) bölgelerinin AS ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010). 2011 yılında yayınlanan başka bir çalışmada Han Çin populasyonununda TNFRSF1A'deki rs4149577 varyantı ve STAT3'teki rs2293152, rs1053005 varyantları ile AS arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (SI. Davidson ve ark., 2011). 362 AS hastası ve 362 sağlıklı kontrolle yapılan bir çalışmada ise, Th17 hücrelerinin değişimini uyaran IL23'deki A1188C genotipinin AS'nin gelişimi ve şiddetiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (RH. Wong ve ark., 2012).

Literatür ışığı altında genom boyu bağlantı çalışmaları sonucu AS ile ilişkili olduğu tespit edilen genlerden bir kısmı tabloda gösterilmiştir (FW. Tsui ve ark., 2014) (Tablo 8).

Tablo 8: Genom boyu bağlantı çalışmaları sonucu elde edilen AS ile ilişkili genler (FW. Tsui ve ark., 2014).

RUNX3	*Runt-related transcription factor 3*
IL23R	*Interleukin 23 receptor*
ERAP1	*Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*
ERAP2	*Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2*
IL27	*Interleukin 27*
CARD9	*Caspase recruitment domain family member 9*
IL12B	*Interleukin 12B*
EOMES	*Eomesodermin*
TNFRSF1A	*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*

4.3. Epigenetik

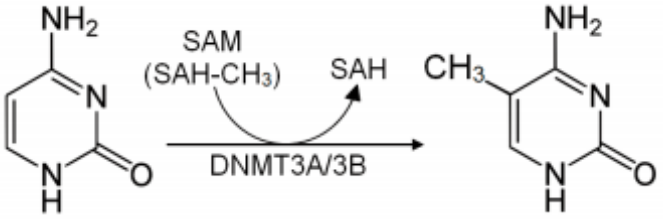
Epigenetik, mutasyonlar ve polimorfizmlerin aksine DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Epigenetik değişimler, DNA dizisinde değişiklik meydana getirmemeleri ve geri döndürülebilir olmaları nedeniyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Epigenetik, aynı DNA'ya sahip hücrelerin ve organizmaların nasıl farklı fenotipik değişikliklere sahip olduğunun temel açıklamalarından biridir. Memelilerde tanımlanmış başlıca epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histonlarda translasyon sonrası değişiklikler ve kromatin yapı değişimleri ve kodlanmayan RNA'ların etkisiyle

oluşur. Epigenetik modifikasyonların, mayoz ve mitoz bölünme yoluyla kalıtılabildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (JP. Hamilton, 2011).

4.3.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, bir DNA dizisindeki sitozin nükleotidinin 5' karbonuna metil grubunun kovalent olarak bağlamasıyla meydana gelir ve insan DNA'sındaki sitozinlerin yaklaşık olarak %3'ü metiledir (J. Newell-Price ve ark., 2000; TM. Nafee ve ark., 2008). Genomda sitozini takip eden guanin dinükleotitlerince zengin bölgelere CpG adaları denmektedir. CpG adaları tüm genlerin yaklaşık yarısının promoter bölgesinde bulunur. Promoter bölgeler dışında CpG dinükleotidlerinin yaklaşık %80'i normal fizyolojik koşullarda metillenmiş durumda bulunur (TM. Nafee ve ark., 2008; M. Gardiner-Garden & M. Frommer, 1987).

DNA Metiltransferazlar (DNMTs) DNA metilasyonundan sorumlu enzim ailesidir. Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B olmak üzere dört DNMTs tanımlanmıştır (JK. Kim ve ark., 2009). DNMT1 yarı metillenmiş olan DNA 'yı metiller bu nedenle metilasyonun devamı için önemlidir. DNMT3A ve DNMT3B metile olmamış CpG dinükleotidlerini metilleyerek de novo (baştan, yeniden) metilasyonu sağlar. Her iki enzim gelişimin farklı evrelerinde görev alır. DNMT3B erken embriyonik dönemde işlev görürken, DNMT3A embriyonik gelişimin ilerleyen aşamalarında görev alır (M.Okano ve ark., 1999). DNMT3A ve DNMT3B metil vericisi olarak S-adenosyl-L-methionine (SAM)'i kullanırlar (MS. Kareta ve ark., 2006; M.Okano ve ark., 1999) (Şekil 6).



Şekil 6: DNA metilasyonu (M.Okano ve ark., 1999).

Diğer DNMTs'lara yapısal benzerlik göstermesine rağmen, DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin çekirdekte lokalize olmasının aksine DNMT2 ilk olarak sitoplazmada lokalize olur. Bunun yanında, DNMT2, genomik metilasyonda görev almaz, aspartik asit transfer RNA'yı (tRNAAsp) metiller (MG. Goll ve ark., 2006).

4.3.1.1. DNA metilasyonu hastalık ilişkisi

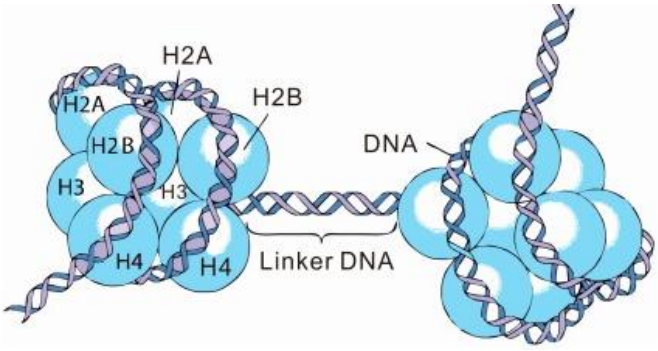
DNA metilasyonu memeli gelişiminde X kromozom inaktivasyonu, genetik damgalama (imprinting), transpozon gibi genetik elementlerin sessizleşmesi gibi çeşitli kritik süreçlerde görev alır. Bunun yanında DNA metilasyonu gen regülasyonunda da önemli rollere sahiptir (E. Carrió & M.Suelves, 2015). Genin kodlayıcı bölgesinde meydana gelen metilasyon düşüşü (hipometilasyon) haberci RNA'nın seviyesinde değişikliklere neden olur. Genin promoter bölgesinde bulunan CpG adalarında meydana gelen metilasyon artışı (hipermetilasyon) genin transkripsiyonel olarak sessizleşmesine ve protein ifadesinin kaybolmasına neden olur (AP. Feinberg & B. Vogelstein 1983; JK. Kim ve ark., 2009). Pankreatik kanser ve DNA hipometilasyonu arasındaki ilişkinin saptanması üzerine yapılan bir çalışmada hipometilasyonun pankreatik kanserde sıklıkla görülen epigenetik bir mekanizma olduğu rapor edilmiştir (N. Sato ve ark., 2003). Otoimmün enflamatuvar bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozus (SLE) için diskordant olan monozigotik ikizlerle yapılan bir çalışmada, hasta ve sağlıklı kardeşler karşılaştırılmış ve hasta kardeşlerde global DNA hipometilasyonu gözlenmiştir. Hastalık patogeneziyle ilişkili olduğu düşünülen 49 genin hasta olan ikizlerde hipometile olduğu rapor edilmiştir (BM. Javierre ve ark., 2010). Başka bir çalışmada sistemik lupus eritamatozuslu (SLE) hastalarda, genom boyu metilasyon analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, B hücrelerinde 166 CpG dinükleotit, monositlerde 97 CpG dinükleotit ve T hücrelerinde 1033 CpG dinükleotit metilasyonunda sağlıklı gruba göre anlamlı bir değişiklik tespit edilmiştir. Üç hücre tipinde de interferon genlerinde hipometilasyon rapor edilmiştir (DM. Absher ve ark., 2013). Genom boyu DNA metilasyon paterninin incelendiği başka bir SLE çalışmasında, hastaların CD4 (+) T hücrelerinde kontrollere göre 236 hipometile ve 105 hipermetile CG bölgesi tespit edilmiştir. Bunun yanında hastalarda otoimmün sistemle ilişkili olduğu bilinen

Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFRA), Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 (BST2) genlerinin hipometile, T hücre olgunlaşmasına etki eden bir transkripsiyon faktörü olan Runt-Related Transcription Factor 3 (RUNX3)'ün hipermetile olduğu rapor edilmiştir (MA. Jeffries ve ark., 2011).

4.3.2. Histon Yapı Değişimleri

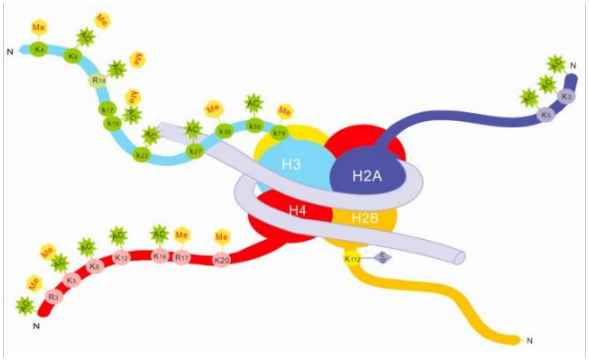
Ökaryotlarda DNA çekirdekte kromatin olarak paketlenmiş halde bulunur. Kromatin, telomerler ve perisentrik bölgelerden oluşan, yüksek tekrar dizileri ve düşük gen içeriğine sahip sessiz heterokromatin ve çok sayıda gen içeren, transkripsiyonel olarak aktif ökromatin bölgelerinden oluşur.

Kromatinin basit yapı birimi nükleozom 147 baz uzunluğundaki DNA'nın sardığı histon sekizlisindem (oktomer) oluşur. H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının herbirinin iki kopyası mononükleozomu oluşturur. Hepsi küresel C-terminal bölge ve N-terminal kuyruğa sahiptir (K. Luger ve ark., 1997; H. Wu ve ark., 2015) (Şekil 7).



Şekil 7: Histonların yapısı (H. Wu ve ark., 2015).

Modifikasyonlar histonların sahip bu kuyruklar aracılığıyla sağlanır (T. Kouzarides, 2007; H. Wu ve ark., 2015) (Şekil 8).



Şekil 8: Histon modifikasyonları (H. Wu ve ark., 2015) (Me: Metilasyon; AC: Asetilasyon; Ub: Ubikitinasyon).

Histon modifikasyonları arjininin (R) metilasyonu, lizinin (K) metilasyonu, asetilasyonu, ubikitinasyon ve sumolasyonu, serin (S) ve treoninin (T) fosforilasyonunu kapsar. Farklı histon modifikasyon enzimlerinin farklı substratları mevcuttur (T. Kouzarides, 2007; H. Santos-Rosa & C. Caldas, 2005; G. Zhang & S. Pradhan, 2014) (Tablo 9).

Tablo 9: Histon modifikasyonu ve sorumlu enzimler (G. Zhang & S. Pradhan, 2014).

Modifikasyon	**Sorumlu Enzim**	**Geri-Modifiye Eden Enzim**	**Görev**
Metilasyon			
H2AR11,H2AR29	PRMT1,PRMT6		Transkripsiyonel baskılama
H3K4	MLL1,MLL2,MLL3, MLL4,MLL5,SET1, SET7/9	LSD1,Swm1,Su(var)3-9,JHDM1b,KDM1B, KDM1A,KDM1C, KDM1D	Transkripsiyonel baskılama ya da aktivasyon

H3K9	SUV39H1,SUV39H2, G9a, EHMT1	LSD1,JHDM2a, JHDM2b,JMJD2A, JMJD2B,JMJD2C	Nükleer gelişim için heterokromatin çapa
H3K27	EZH1,EZH2	UTX,JMJD3	Gen sessizleşmesi
Asetilasyon			
H3K4,H3K9, H3K36	KAT2A,KAT2B	HDAC1,HDAC2	Transkripsiyonel aktivasyon
Fosforilasyon			
H2AS139	ATR,ATM,DNA-PK		DNA tamiri
H3S10	Aurora-B,MSK1,MSK2, IKK-α	PP1	Mitoz,mayoz ve transkripsiyonel aktivasyon

(PRMT, *protein arginine methyltransferases*; MLL, *mixed-lineage leukemia protein;* JMJD, *Jumonji domain-containing protein*; SET, Su(var)3-9, *Enhancer-of-zeste, Trihorax domain protein*; LSD, *Lysine-spesific demethylase*; JHDM, *JmjC domain-containing histone demethylase*; KDM, *lysine (K) spesific demethylase*; SUV39H1, *suppressor of variegatio 3-9 hmolog 1*; EZH, *enhancer of zeste*; IKK-α, *IkB kinase α*; MSK, *mitogen and stress activated protein kinase*; ATM, *ataxia telangiectasia mutated;* DNA-PK, *DNA dependent protein kinase*; UTX, *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome;* EHMT1, *euchromatic histone demethylase*)

4.3.2.1. Histon yapı değişimleri hastalık ilişkisi

Histonların post translasyonel modifikasyonları dinamik enzim aileleri tarafından düzenlenir. Histonların asetilasyonu, histonların N terminal bölgesinde bulunan lizin rezidülerini modifiye eden histon asetiltransferazlar (HATs) tarafından katalizlenir. Bunun yanında histonların deasetilasyonu çok alt gruplu enzim aileleri olan histon deasetilazlar (HDACs) tarafından kontrol edilir (AJ. de Ruijter ve ark., 2003). HDACs histonlardan asetil gruplarının uzaklaştırılmasını sağlarlar ve bunun sonucunda oluşan hipoasetilasyon histonlar ve onların etrafını saran DNA arasındaki

boşluğun azalmasına neden olur. Bu durum, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasına engel olarak etkiledikleri genin sessizleşmesini sağlarlar (SD. Briggs ve ark., 2002). Histon metiltransferazlar arjinin ve lizin rezidülerine metil grubunun eklenmesini sağlarlar. Histon kinazlar ise serin ve treonin rezidülerini fosforillenmesinden sorumludurlar (SL. Berger, 2007).

Genlerin hiperasetilasyon ve hipoasetilasyonunun çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. HDAC inhibitörlerinin kanser tedavisinde yararlı teröpatik ajan olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (TY. Kim ve ark., 2006). Otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozus (SLE) için hayvan modeli kullanarak yapılan bir çalışmada, trichostatin A (TSA) gibi HDAC inhibitörlerinin (HDIs) SLE'nin tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (N. Mishra ve ark., 2006). Romatoid artirit (RA) hastalarının ve sağlıklı kontrollerin eklemlerinden elde edilen sinoviyal dokularında yapılan analiz sonucu nükleer HDAC aktivitesinin ve HDAC1'in mRNA ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (T. Kawabata ve ark., 2010). Yirmi bir ankilozan spondilit (AS) ve otuz sekiz sağlıklı kontrolün periferal kan mononükleer hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada, HDAC/HAT aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı rapor edilmiştir (E. Toussirot ve ark., 2013). Romatoid artirit (RA) hastalarının analizinin yapıldığı başka bir çalışmada, hastalardaki HDAC aktivitesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede arttığı gösterilmiş ve bunun sonucunda RA'da HDAC aktivitesinin bozulduğu ve bu durumda tedavi için hedef gösterilebileceği belirtilmiştir (J. Gillespie ve ark., 2012).

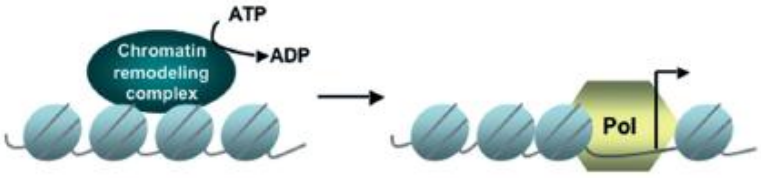
Bu modifikasyonların önemi tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, lizin asetilasyonu ve metilasyonunun transkripsiyonel aktivasyon ya da baskılamayla ilişkili olduğu tanımlanmıştır (T. Kouzarides, 2007). Lizinin asetilasyon/deasetilasyonu kromatinin ulaşılabilirliği ve transkripsiyonla bağdaştırılmasına rağmen lizin metilasyonunun etkisi metil gruplarının sayısına ve lizin kuyruklarındaki pozisyonuna göre değişmektedir. Örneğin, H3K9 (histon H3 lizin 9) ve H3K27 (histon H3 lizin 27)'deki trimetilasyon heterokromatin modifikasyonuyla ilişkilendirilirken, H3K4 (histon H3 lizin 4)'deki trimetilasyon,

H3 (histon H3) ve H4 (histon H4)'deki asetilasyon aktif trankripsiyonla ve ökromatin modifikasyonuyla ilişkilendirilmiştir (W. Fischle ve ark., 2003; MG. Pray-Grant ve ark., 2005).

Romatoid artiritin patogenezinde yer alan epigenetik faktörlerin tanımlanması için RA hastalarından alınan mononükleer hücrelerin kullanıldığı bir çalışmada, faktörlerin ekspresyon seviyelerinin profilini oluşturmak üzere PCR Array yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda RA hastalarında, histon kinazlar; (AURKA, AURKB ve NEK6), asetiltransferazlar; (ESCO2 ve KAT2B), deasetilazlar; (HDAC1 ve HDAC11), metiltransferazlar; (SETD6, SETDB2 ve PRMT6), demetilazlar; (KDM5C ve KDM6B) ve protein degredasyon–promoting ubikitin ligazlar; (DZIP3 ve UBE2B) olmak üzere 14 adet genin ifadesinin anlamlı şekilde arttığı ya da azaldığı tespit edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013).

4.3.3. Kromatin yeniden düzenleyiciler

Birçok durumda, kromatin modifikasyonlarının epigenetik rollleri bir kısım özelleşmiş nükleer protein setleri tarafından arttırılır ancak bu protein setleri direk olarak kromatin modifikasyonuna katılmayıp epigenetik düzenlemede kritik rollere sahiptir. Bu kategorideki proteinlerden en önemlileri kromatin yeniden düzenleme bileşkeleridir. Kromatin yeniden düzenleyiciler, ATP (adenozin trifosfat) enerjisini kullanan, gen ifadesini aktive etmek ya da baskılamak için histon modifiye edicilerle birlikte görev yapan enzim aileleridir. Bu kompleksler, bir ya da iki nükleozomu kaplayarak lokal kromatin yapısının değişmesine neden olurlar (A. Saha ve ark., 2006; CS. Kwon & D. Wagner, 2007; JK. Kim ve ark., 2009) (Şekil 9).



Şekil 9: Kromatin yeniden düzenleyicilerin rolü (JK. Kim ve ark., 2009).

İnsanda iyi tanımlanmış kromatin yeniden düzenleme kompleksleri SWI/SNF *(switching defective/ sucrose non-fermenting)* ailesi, ISWI *(imitation SWI)* ailesi, NuRD *(nucleosome remodeling and deacetylation)*/Mi-2/CHD *(chromodomain, helicase, DNA binding)* ailesi ve INO80 *(inositol requiring 80)* ailesidir (GG. Wang ve ark., 2007) (Tablo 10).

Tablo 10: İnsan ATP bağlı kromatin yeniden düzenleyicileri ve hücresel fonksiyonları (GG. Wang ve ark., 2007).

Aile ve Kompleksler	**Yeniden Düzenleme Kompleks Alt üniteleri**	**Kompleks Fonksiyonları**
SWI/SNF Ailesi		
BAF	BRM,BRG1,SNF5/INI1, BAF155,BAF170, BAF250, BAF53, β-actin	Tümör baskılayıcı, hücre döngüsünün ilerlemesi, DNA replikasyon, gelişim, farklılaşma, DNA hasar tamiri
BRM	BRM,SNF5/INI1,BAF155, BAF170,BAF250,BAF53, BAF60a	
ISWI Ailesi		
ACF/WCRF	SNF2H, WCRF180/ACF1	X kromozom regülasyonu, kohezyon, embriyonik gelişim ve farklılaşma, transkripsiyonel aktivasyon ve represyon, replikasyon
CHRAC	SNF2H,ACF1,CHRAC17, CHRAC15	
RSF	SNF2H,p325	
WICH	SNF2H,WSTF	
NURD/Mi-2/CHD Ailesi		

NURD/Mi-2/CHD	Mi2-α CHD3 ya da Mi2-β CHD4 ya da CHD1-2 ya da CHD5, HDAC1,HDAC2,RbAp46, RbAp48,MTA1,MBD2 ya da MBD3	Tümör baskılayıcı,transkripsiyonel baskılama ve susturma, transkripsiyonel aktivasyon,
INO80 Ailesi		
INO80	hINO80,Tip49a,Tip49b,BAF53a, Arp5,Arp8	

(ACF, *ATP-utilizing chromatin-assembly and remodeling factor;* BAF, *BRGI-associated factor;* CHRAC, *chromatin-accessibility factor;* EBAF, *ENL (a fusion partner of MLL in mixed-lineage leukemia)-associated BAF-containing complex*; ENL, *eleven-nineteen leukemia gene*; MBD, *methyl-CpG-binding domain protein;* PBAF, *polybromo and BRGI-associated factor;* RSF, *remodeling and spacing factor;* SA1, *stromal antigen 1;* SMC1, *structural maintenance of chromosomes 1A;* WICH, *WSTF-ISWI chromatin remodeling;* WSTF, *Williams syndrome transcription factor*)

4.3.3.1. Kromatin yeniden düzenleyiciler hastalık ilişkisi

Kromatin yeniden düzenleyicilerin Ankilozan Spondilit ya da benzer diğer hastalıklar için rapor edilen bir çalışması bulunmamasına rağmen çeşitli kanser türlerinde ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. SWI/SNF mutasyonlarının pankreatik kanserde %26, hepatoselüler karsinomada %40, melanomada %34, mide kanserinde ise %36 oranında görüldüğü belirtilmiştir (JA. Biegel ve ark., 2014; AH. Shain & JR. Pollack, 2013).

4.3.4. Kodlamayan RNA'lar

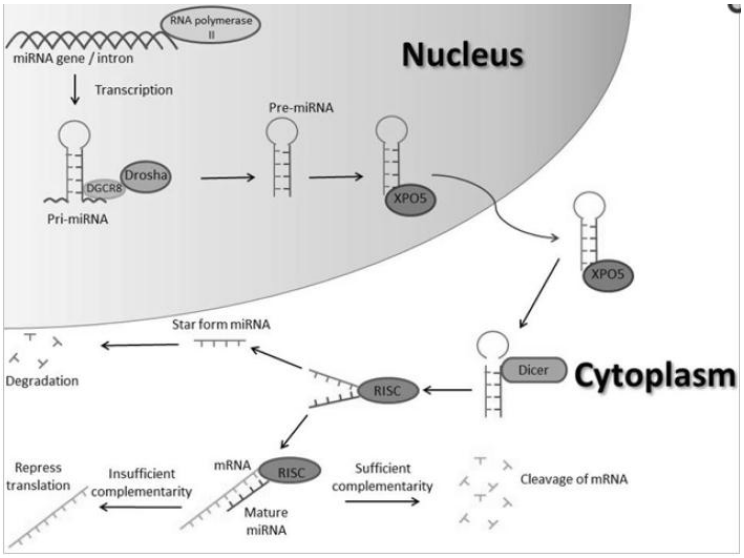
Gen ekspresyonu, genomik kararlılığın sağlanması gibi çeşitli anahtar olaylarda kilit rol üstlenen kodlamayan RNA'lar kısadan uzuna kadar çeşitlilik gösterir (BP. Lewis ve ark., 2003). Kısa kodlamayan RNA'lar; tRNA'lar, rRNA'lar, küçük nükleer RNA'lar (snRNAs) ve küçük nükleolar RNA'lar (snoRNAs) uzun zamandan beri bilinmektedirler. Çeşitli düzenleyici rollere sahiptirler. Örneğin U1 snRNA transkripsiyon aktivasyonunun düzenlenmesinde görevlidir (KY. Kwek ve ark.,

2002). Küçük kodlanmayan RNA'lar daha büyük RNA öncül moleküllerinden elde edilirler.

MikroRNA'lar (miRNAs), kısa interfering RNA'lar (siRNAs), PIWI-interacting RNA'lar (piRNAs) ve repeat-associated RNA'lar (rasiRNAs) bu gruba dahildirler (TA. Farazi ve ark., 2008).

En çok çalışılmış olan kodlanmayan RNA'lar mikro RNA (miRNA)'lardır. Son zamanlarda post-transkripsiyonel düzenleyiciler olarak incelenmeye alınmışlardır. Bu kısa (19-22 nükleotid uzunluğunda), endojen, tek zincirli, kodlanmayan RNA'lar genlerin yaklaşık %30'unu düzenler (BP. Lewis ve ark., 2003). miRNA'lar birçok genin ifadesini post transkripsiyonel aşamada translasyonu baskılayarak ya da *RNA interfering silencing* bileşkesi (RISC) ile direk olarak mRNA degradasyonunu indükleyerek düzenleyen, kodlama yapmayan RNA molekülleridir. miRNA'lar gen susturulmasında hedef aldığı mRNA'nın translasyonel etkinliği ya da stabilitesini düzenler. miRNA'nın hedef dizi üzerindeki etkisi miRNA ve mRNA arasındaki baz eşleşmesinin oranına bağlıdır. Tam eşleşmenin olmadığı durumlarda miRNA, mRNA'nın translasyonunu baskılarken; eşleşmenin tam olduğu durumlarda ise miRNA, mRNA'nın kesimi ve yıkımını gerçekleştirir (R. Benetti ve ark., 2008 ; S. Yan ve ark., 2014) (Şekil 10).

SiRNA'lar miRNA'larla benzer uzunluktadır ancak miRNA'lardan farklı olarak çift zincirli RNA'lardan elde edilirler. piRNA'lar 22-33 nükleotit uzunluğundaki RNA'lardır ve tek zincirli öncül moleküllerden elde edilirler (CD.Malone & GJ. Hannon, 2009).



Şekil 10: miRNA olgunlaşma yolağı; miRNA biyojenezi RNA polimeraz II tarafından çekirdekte başlar. Transkripsiyon ürünleri farklı boylardaki hairpin yapıdaki pri-miRNA'ları oluşturur. Oluşan pri-miRNA'lar RNase III enzim Drosha ve dsRNA binding domain protein DiGeorge Syndrome critical region 8 (DGCR8)'in oluşturduğu kompleksle 70-120 baz uzunluğundaki öncül miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülür. Pre-miRNA'lar exportin 5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'lar sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz ile etkileşerek olgun miRNA'ya dönüşürler (S. Yan ve ark., 2014).

4.3.4.1. Kodlamayan RNA'lar hastalık ilişkisi

Kodlamayan RNA'ların birçok patolojiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çeşitli hastalıklarda normal olmayan miRNA ekspresyonu tanımlanmıştır. Örneğin prostat kanserli hastalarda miR-223-3p'nin up-regüle olduğu rapor edilmiştir (Y. Wei ve ark., 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalar miRNA'ların dolaşımda tespit edilebilir olduğunu ve bu nedenle biyobelirteç olarak kullanılabileceklerini göstermiştir. SLE, RA ve sağlıklı kontrollerin kullanıldığı bir çalışmada miR-21, miR-451, miR-223 ve miR-16'nın SLE hastalarında up-regüle olduğu aynı zamanda RA hastalarında da ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların aksine miR-125a-3p, miR-155 ve miR-146a'nın ekspresyonlarının SLE hastalarında azaldığı rapor edilmiştir (H. Wang ve ark., 2012). Romatoid artiritli hastalarla yapılan bir çalışmada, hastaların kan mononükleer hücrelerinde miR-146a, miR-155, miR-132, miR-16'nın ekspresyon seviyelerinin sağlıklı bireylere göre artmış olduğu rapor edilmiştir (KM. Pauley ve ark., 2008). Romatoid artiritli

hastalarda yapılan başka bir çalışmada ise, miR-24 and miR-125a-5p'nin ekspresyon seviyeleri sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuş ve bu miRNA'ların hastalık tanısında kullanılabileceği düşünülmüştür (K. Murata ve ark., 2013). SLE hastalarının katıldığı bir çalışmada, hastalarda B hücrelerinin büyümesi, aktivasyonu ve proliferasyonunda görev alan Early B cell factor 1 (EBF1)'i hedef alan mir-1246'nın ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre anlamlı ölçüde azalmış olduğu rapor edilmiştir (S. Luo ve ark., 2015). 5 AS hastası ve 5 sağlıklı kontrolün katıldığı bir çalışmada miR-16, miR-221 ve let-7i'nin AS hastalarının T hücrelerinde sağlıklı kontrollere göre yüksek ekspresyonu tespit edilmiştir (NS. Lai ve ark., 2013).

Tüm bu literatür ışığı altında, AS için diskordant monozigotik ikizlerle ve radyolojik olarak ağır-hafif (hasta) ayrımı sağlanmış bireylerle yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak, daha büyük bir grupta yapılan çalışma için, artirit gelişimi ve romatoid artiritin patogeneziyle ilişkisi olduğu rapor edilen epigenetik modifiye edicilerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin, hastalığın tanı ve seyriyle ilişkisinin ortaya konması, tanıda belirteç olarak kullanılabilecek AS'ye özgü kodlayıcı bölgelerin tanımlanması amaçlanmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubuna ait bireyler 5 Eylül 2014 tarihli 09. 2014. 0170 protokol kodlu Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayının ardından, Marmara Üniversitesi Romatoloji Kliniği'nde takip edilen AS tanısı almış hastalardan toplanmaya başlanmıştır. Hastalardan yazılı ve sözlü aydınlatılmış onam varlığında rutin tetkikleri sırasında periferal kan örnekleri Norgen Blood RNA Preservative tüplere alınmıştır.

Çalışmaya, Marmara Üniversitesi Romatoloji Kliniği'nde 2012 yılından itibaren takip edilen AS tanısı almış spondiloartropati grubu hastalık (reaktif artirit, psöriyatik artirit, enflamatuar barsak hastalığı vb) için tanı almamış ve sistemik enflamatuar hastalığı olmadığı bilinen, 1 çift diskordant monozigotik ikiz ve radyolojik skorlamayla elde edilen klinik verilere göre 2 ağır hasta ve 2 hafif hasta dahil edilmiştir. Hasta olan ikiz kardeş radyolojik skoruna göre hafif hasta olarak tanımlanmıştır. Hastaların klinik olarak ağır ve hafif seyirli AS olarak sınıflandırılmasında servikal ve lumbosakral vertebraların iki yönlü düz grafi görüntülemelerinin yorumlanmasına dayanan MSASSS (Modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score) ve RASSS (Radiographic Ankylosing Spondylitis SpineScore) puanlama araçları kullanılmıştır (MC. Creemers ve ark., 2005). Sağlıklı ikiz kardeş kontrol olarak kullanılmıştır.

5.2. Kullanılan Aletler

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu -80 °C Thermo (A.B.D)

Derin Dondurucu -20 °C Bosch (Almanya)

Etüv, Heraeus (Almanya)

Kırık Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)

Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)

Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)

Otoklav, All American (A.B.D)

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)

Isı Döngü Cihazı, Techne (İngiltere)

Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)

Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)

Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen (A.B.D.)

BioRad CFX Connect Real Time System, (A.B.D.)

5.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Falkon Tüp 50 mL, TPP (İsviçre)

Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)

Ependorf Tüp 1,5 mL, Axygen (A.B.D.)

Ependorf Tüp 2,0 mL, Axygen (A.B.D.)

Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

Ependorf Tüp 0,5 µL, Axygen (A.B.D.)

Norgen Blood RNA Preservative Tüp, (Kanada)

Norgen Blood RNA Purification Kit, (Kanada)

GeneOn Gmb First Strand cDNA PLUS Synthesis Kit, (UK)

Ankylosing Spondylitis Gene Expression Panel (probes, primers, reference genes, PCR master mix, plates), Biospeedy (Türkiye)

Qubit RNA HS Assay Kit, Life Technologies, (A.B.D.)

5.4. Kullanılan Kimyasallar

Etanol, Merck, (Almanya)

B-merkaptoetanol, Sigma, (A.B.D.)

One-Fusion DNA Polimeraz Enzim Seti, Gene On, (UK)

dNTP Set, GeneOn, (UK)

Primerler, Integrated DNA Technologies, (A.B.D.)

Eva Green Boyası 20X, Biotium, (Hayward CA)

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

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

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

5.5.Kullanılan Primerler

Primerler liyofilize formda alınıp steril distile su ile sulandırılarak ana stok oluşturulmuş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

5.6.Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır.

5.6.1.Kandan RNA izolasyonu

Yıkama tamponu

Kitte sağlanan Wash Buffer

50 ml %100 etanol (EtOH) eklendi.

Resüspansiyon Tamponu

4 ml tampon için 40 ml B-merkaptoetanol eklendi.

5.6.2. cDNA sentezi

Reaksiyon tamponu (5X)

İkiyüzelli mM Tris-HCI (pH 8,3), 375 mM KCI, 15 mM MgCl2, 50 mM DTT içeren reaksiyon tamponu GeneOn Gmb First Strand cDNA PLUS Synthesis Kit (UK) seti ile temin edilmiştir.

5.6.3. Gerçek zamanlı kantitatif PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyou) ile ekspresyon ölçümü

Reaksiyon tamponu (2,5X)

One-Fusion DNA Polimeraz Enzim Seti, Gene On (UK) ile temin edilmiştir.

10mM dNTP

Her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dCTP, dGTP solüsyonlarından 10'ar µl alınarak karıştırıldı ve üzerine 60 µl steril dH2O eklenerek hazırlandı.

Primerler

İkiyüz pmol primer stoklarından hazırlanan 10 pmol/µl konsantrasyonundaki çözeltiler kullanılmıştır.

5.7. Periferal Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu

Hastaların periferal kan örneklerinden RNA izolasyonu Norgen Blood RNA Purification Kit kullanılarak üretici firma yönergeleri doğrultusunda yapıldı.

i. Yıkama tamponuna 50 mililitre (ml) %100 etanol (EtOH), resüspansiyon tampona 4 ml için 40 ml B-merkaptoetanol eklendi.

ii. Hastaların Norgen Blood RNA Preservative Tüp içinde bulunan periferal kan örneklerinden 8 ml alındı ve üzerine 1 ml PBS eklenerek 9 ml'ye tamamlandı.

iii. PBS ile karıştırılan kan örnekleri 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.

iv. Falkon tüplere 1,5 ml RNA Ekstraksiyon Tampon A ve 1,5 ml RNA Ekstraksiyon Tampon B eklendi.

v. Tüpler maksimum hızda 30 saniye vortekslendi ve karışması sağlandı.

vi. Örnekler hızlı bir şekilde -20°C'ye kaldırılarak 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

vii. İnkübasyonun ardından örnekler 4°C'de 5000 g'de 30 dakika santrifüjlendi.

viii. Santrifüjün ardından supernatant atıldı ve tüpler ters çevrilerek pelletin kuruması için2 dakika beklendi.

ix. Kuruyan pelletlerin üzerine 570 µl Resüspansiyon Tamponu eklenerek RNA pelletinin tekrar süspansiyon hale gelebilmesi için vortekslendi.

x. Örneklerin üzerine 330 µl %100 EtOH eklenerek tekrar vortekslenerek karışması sağlandı.

xi. Kit içerisinde bulunan toplama tüpleri ve filtreler birleştirilerek lizattan 450 µl filtre üzerine eklendi ve 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek RNA'nın filtreye bağlanması ve diğer maddelerin sıvı fazda kalması sağlandı. Toplama tüplerinde kalan sıvılar atıldı.

xii. 11. basamaktaki işlem lizatın tamamının filtrelerden geçmesini sağlamak üzere 2 defa daha tekrar edildi.

xiii. Filtre üzerine 400 µl yıkama tamponu eklendi, 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek kontaminantlar uzaklaştırıldı.

xiv. Filtre üzerine 400 µl yıkama tamponu eklendi, 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek kontaminantlar uzaklaştırıldı.

xv. Filtre üzerine 400 µl yıkama tamponu eklendi, 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek kontaminantlar uzaklaştırıldı.

xvi. 14.000 g'de 2 dakika santrifüjlenerek filtrenin kuruması sağlandı.

xvii. Yeni toplama tüpüne alınan filtreye 150 µl Elüsyon Tamponu eklendi. 200 g'de 2 dakika santrifijün ardından 14.000 g'de 1 dakika daha santrifüj yapılarak filtreye bağlanan RNA'nın elüsyon tamponu içerisinde toplanması sağlandı.

xviii. Elde edilen RNA'lardan 3 µl RNA stoğu ve 7 µl dH_2O ile bir karışım hazırlanarak ekspresyon çalışması öncesi DNA kontaminasyonun kontrolü için negatif kontroller oluşturuldu.

xix. Geri kalan RNA'lar -80°C'de saklandı.

5.8. RNA Kantitasyonu

İzolasyon sonucu elde edilen RNA'ların konsantrasyonu Qubit RNA HS Assay Kit ve Qubit 2.0 Fluorometer yardımıyla ölçüldü. Ölçüm için 2 standart hazırlandı. Her standart ve örnek için çalışma solüsyonu; total hacim 200 µl olmak üzere, Qubit® RNA HS Reagent'ın Qubit® RNA HS Buffer içinde 1:200 seyreltilmesiyle hazırlandı. Bu işlemin ardından hazırlanan solüsyondan 190 µl ve kit içerisinde bulunan standart #1'den 10 µl olmak üzere 0,5 ml'lik tüplere konuldu. Karışım vortekslendikten sonra 1 dakika inkübasyonun ardından standart ölçümü yapıldı. Aynı işlem standart #2 için de gerçekleştirildi. Cihaz bu ölçümleri kullanarak standart bir eğri çizdi. Ardından örneklerin ölçümüne geçildi. Hazırlanan çalışma solüsyonundan 199 µl ve izole edilen RNA'lardan 1 µl 0,5'lik tüplere konuldu. Vortekslendikten sonra 1 dakika inkübe edilen örneklerin ölçümü gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçları not edildi.

5.9. RNA'dan cDNA Sentezi

cDNA sentezi, RNA stok solüsyonundan 6 µl (3 ng-50 ng) alınarak, GeneOn Gmb First Strand cDNA PLUS Synthesis Kit içerisinde bulunan kimyasallar ile üretici firma yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

6 µl RNA üzerine 2 µl oligo dT eklendi ve 70°C'de 10 dakika ısısal döngüleyici (Thermal Cycler) cihazında bekletildi. Bekleme sırasında her bir örnek için aşağıdaki reaksiyon içeriği hazırlandı (Tablo 11).

Tablo 11: cDNA sentezi için hazırlanan 2. karışım.

5X Reaksiyon Tamponu	dNTP Mix	Reverse Transkriptaz	RNAz Free Su
4 µl	1 µl	1 µl	6 µl
Toplam Hacim 20 µl'ye tamamlandı.			

Hazırlanan 2. karışım tüplere eklendikten sonra ısısal döngü cihazında sırasıyla 45°C'de 1 saat ve enzimin inaktif olabilmesi için 65°C'de 10 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

5.10. RNA Ekspresyonunun Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Reaksiyonu İle İncelenmesi (PCR Array)

Gerçek zamanlı kantitatif PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) olarak bilinen kantitatif PZR nükleik asitlerin çoğalması için kullanılan güçlü bir yöntemdir. Sistemdeki anahtar, çoğalma sırasında floresan boyalarla çoğalmanın gerçek zamanlı takibine olanak sağlamasıdır. Eva Green bu boyalardan biridir. Çift iplikli DNA'ya bağlanarak ışıma verir. Çoğalma sırasında primerlerin bağlanmasının ardından geçilen uzama evresinde DNA'ya bağlanan Eva Green miktarı artar ve bunun sonucu olarak yayılan floresan miktarı artar. SYBR Green gibi boyaların aksine, Eva Green'le yapılan çalışmalarda daha düşük PZR inhibisyonu ve boyadan

kaynaklı meydana gelen spesifik olmayan çoğalmanın nispeten daha düşük olduğu tespit edilmiştir (F. Sang & J. Ren, 2006; F. Mao ve ark., 2007).

Eva Green boyasından alınan ışımanın bir eşik değeri vardır. Işımanın eşik değerinin aşıldığı noktaya Ct (cycle threshold) ya da Cp (crossing point) değeri denir. Eşik değerinin aşıldığı an DNA'nın çoğaldığından emin olunmaktadır. Ancak eşik değerinin aşıldığı istenilen bölgenin çoğaldığının kanıtı olmadığından çoğalan bölgenin erime sıcaklığı incelenmelidir. Çift iplikli DNA'nın %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık erime sıcaklığı adını alır. Erime sıcaklığı DNA'nın uzunluğuna ve baz içeriğine bağlı olarak değişir. Bu yöntemde PZR ile çoğaltılan DNA dizisinin erime sıcaklığı görüntülenebilmektedir. Benzer sıcaklık aralarından alınan pikler istenilen DNA dizisinin çoğaldığı anlamına gelmektedir.

Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile, belirli koşullar altında, hastadan hastaya, dokudan dokuya, hücreden hücreye ekspresyonu değişmeyen bir ''housekeeping'' gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonuyla kıyaslanmasına dayanan göreceli kantitasyon yöntemiyle inceleme sağlanabilmektedir (EM. Glare ve ark., 2002). Bu yönteme delta delta Ct yöntemi denir. Yöntem aşağıdaki formüle dayalı kantitasyon yapar.

$$R = \frac{(E\ \text{hedef})^{\Delta Cp\text{hedef (kontrol-örnek)}}}{(E\ \text{referans})^{\Delta Cp\text{referans (kontrol-örnek)}}}$$

Formüldeki oran (R) hedef gen ekspresyonun kontrole oranını, E; verimliliği (efficiency), ΔCP ise Ct değerlerinin farkını temsil etmektedir. Hedef gen ve referans genin verimlilikleri birbirlerine eşit ve 2 kabul edildiğinde hesaplamaların yapılacağı formül aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$R = 2^{-(\Delta CP\ \text{örnek} - \Delta CP\ \text{kontrol})}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Reaksiyon Gene On One-Fusion DNA Polimeraz Enzim Seti içerisinde bulunan kimyasallar, Eva Green Boyası, Integrated DNA Technologies firması tarafından

sentezlenen primerler ve dNTP mix kullanılarak BioRad CFX Connect Real Time System cihazında satıcı firma yönergelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon her bir gen için aşağıdaki gibi hazırlandı (Tablo 12).

Tablo 12: Her bir örnek için hazırlanan PZR içeriği.

dH_2O	Eva Green	Buffer	dNTP Karışımı	Forward Primer	Reverse Primer	Enzim	Template
2,3 µl	0,4 µl	4 µl	0,2 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,1 µl	2 µl
Toplam Hacim 10 µl							

Reaksiyonda kullanılan primer ve kodları Tablo 13 ‘de verilmiştir. Parantez içindeki sayılar primer kodlarını temsil etmektedir. Primerler Primer3 yazılımı (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/ Erişim tarihi: 15 Eylül 2015) kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerlerin kontrolleri Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ Erişim tarihi: 15 Eylül 2015) ile yapıldı. Bilgisayar ortamında kontrol edilen primerlerin çalışıp çalışmadığı reaksiyon ile kontrol edildi.

Tablo 13: PZR reaksiyonunda kullanılan primer ve kodlar.

Kromatin Yeniden Düzenleme Kompleksleri							
Metil-CpG DNA’ya Bağlanan Proteinler							
MBD4-F-R (15)	MBD3-F-R (70)	MECP2-F-R (56)					
CCCTC – Bağlanma Faktörü							

CTCF-F-R (43)							
Kromatin Modifiye Edici Enzimler							
Histon Fosforilasyon							
AURKA-F-R (1)	AURKC-F-R (16)	AURKC-F-R (25)	NEK6 F-R (39)	PAK1-F-R (52)	RPS6KA3-F-R (66)	RPS6KA5-F-R (11)	
DNA Metiltransferazlar							
DNMT1-F-R (57)	DNMT3B-F-R (30)	DNMT3A-F-R (44)					
Histon Asetiltransferazlar							
ATF2-F-R (71)	CDYL-F-R (2)	CIITA-F-R (17)	CSRP2BP-F-R (31)	ESCO1-F-R (45)	ESCO2-F-R (58)	HAT1-F-R (72)	KAT2A-F-R (3)
KAT2B-F-R (18)	KAT5-F-R (32)	MYST1-F-R (46)	MYST2-F-R (59)	MYST3-F-R (73)	MYST4-F-R (4)	NCOA1-F-R (19)	NCOA3-F-R (33)
NCOA6-F-R (47)							
Histon Metiltransferazlar							
CARM1-F-R (74)	DOT1L-F-R (5)	EHMT2-F-R (20)	PRMT1-F-R (48)	PRMT2-F-R (61)	PRMT3-F-R (75)	PRMT5-F-R (6)	PRMT6-F-R (21)

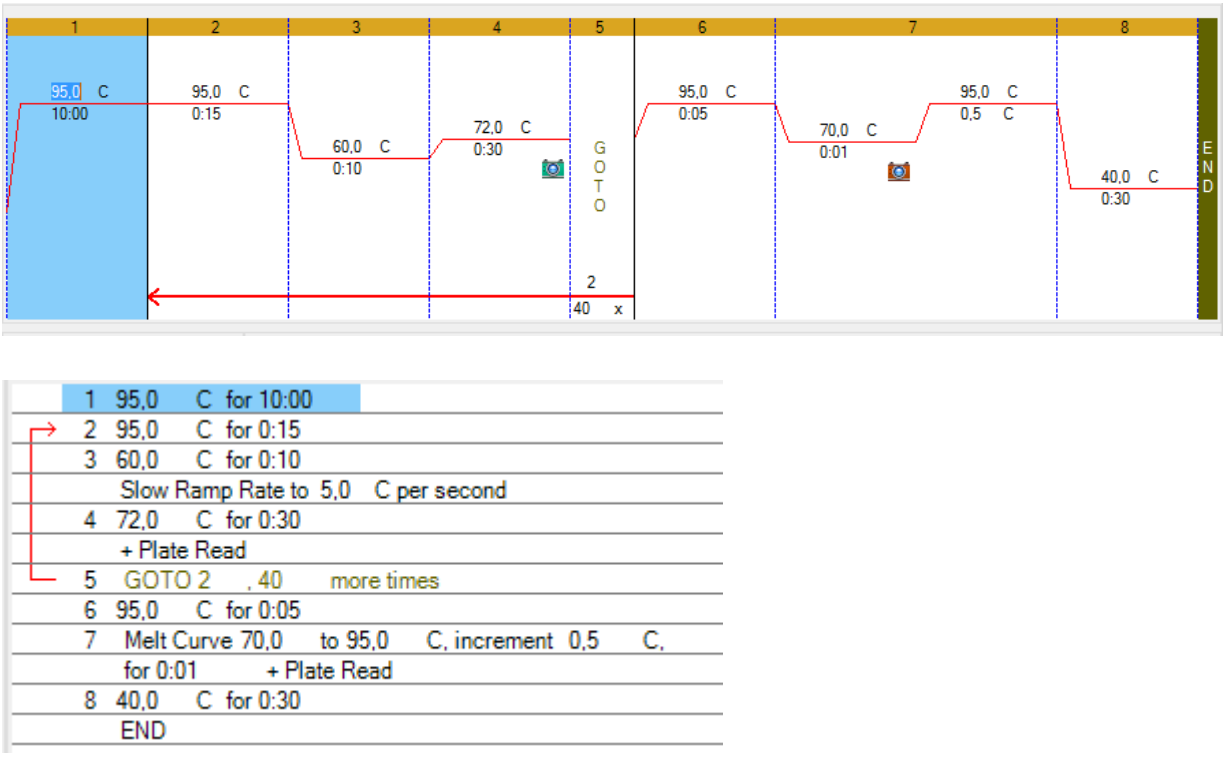
PRMT7-F-R (35)	PRMT8-F-R (49)	SETDB2-F-R (62)	SMYD3-F-R (76)	SUV39H1-F-R (7)	MLL3-F-R (36)	MLL5-F-R (50)	MLL-F-R (34)
SET Domain Proteinleri (Histon Metiltransferaz Aktivitesi)							
ASH1L-F-R (22)	NSD1-F-R (63)	SETD1A-F-R (77)	SETD1B-F-R (8)	SETD2-F-R (23)	SETD3-F-R (37)	SETD4-F-R (51)	SETD5-F-R (64)
SETD6-F-R (78)	SETD7-F-R (9)	SETD8-F-R (24)	SETDB1-F-R (38)	SUV420H1-F-R (65)	WHSC1-F-R (10)		
DNA&Histon Demetilazlar							
KDM5A-F-R (60)	KDM5B-F-R (26)	KDM5C-F-R (40)	KDM4A-F-R (53)	KDM4C-F-R (67)	KDM6B-F-R (12)	MBD2-F-R (27)	
Histon Deasetilazlar							
HDAC1-F-R (41)	HDAC2-F-R (54)	HDAC3-F-R (68)	HDAC4-F-R (13)	HDAC5-F-R (28)	HDAC6-F-R (42)	HDAC7-F-R (55)	HDAC8-F-R (69)
HDAC9-F-R (14)	HDAC11-F-R (29)						

Örnekler analiz edilmeden önce negatif kontroller (RNA izolasyonundan sonra seyreltilmiş örnekler) ve pozitif kontroller (cDNA sentezi gerçekleştirilmiş örnekler)

sırasıyla RNA izolasyonu sırasında DNA kontaminasyonu olup olmadığını ve cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek amacıyla çalışıldı. Kontroller için kurulan reaksiyon tablo 11'de verilen içeriğe uygun olarak hazırlandı.

Çalışma sırasında ''housekeeping'' gen olarak bilinen GAPDH (80 numaralı gen) (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) kullanıldı (RD. Barber ve ark., 2005).

PZR protokolü ve döngü koşulları aşağıdaki gibidir (Şekil 11)(Tablo 14).



Şekil 11: Gerçek Zamanlı PZR protokolü.

Tablo 14: Gerçek Zamanlı PZR döngü koşulları.

	Sıcaklık (°C)	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Başlangıç Denatürasyonu	95	10 dakika	

Denatürasyon	95	15 saniye	40 döngü
Primerlerin Bağlanması	60	10 saniye	
Uzama	72*	30 saniye	
Erime Eğrisi (Melting Curve)	95	5 saniye	
	70**	1 saniye	
	95**	5 saniye	
Soğuma	40	30 saniye	

*Uzama evresinin sonunda floresan sinyal ölçülür.

**Her 1 saniyede 0,5°C artış göstererek 70°C'den 95°C'ye çıkılır, floresan sinyal ölçülür.

6. BULGULAR

6.1. RNA Konsantrasyon Sonuçları

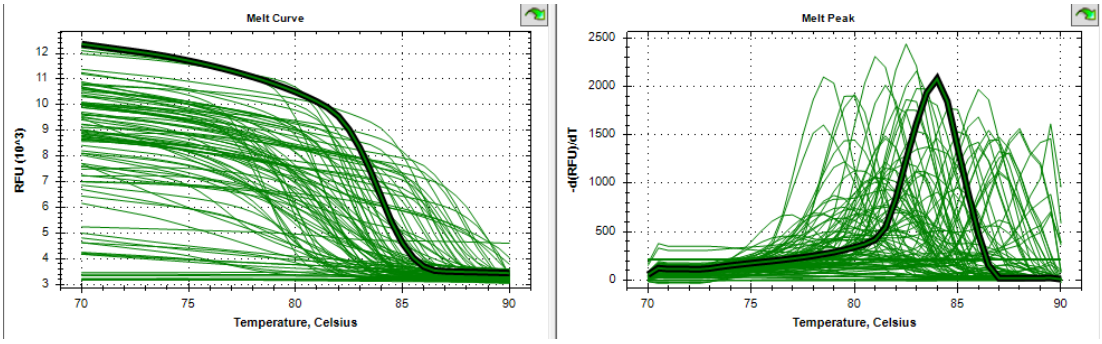
Beş hasta ve bir sağlıklı bireyin periferal kanlarından izole edilen RNA konsantrasyonları deneylerde kullanılabilir aralıktadır. Konsantrasyon değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 15).

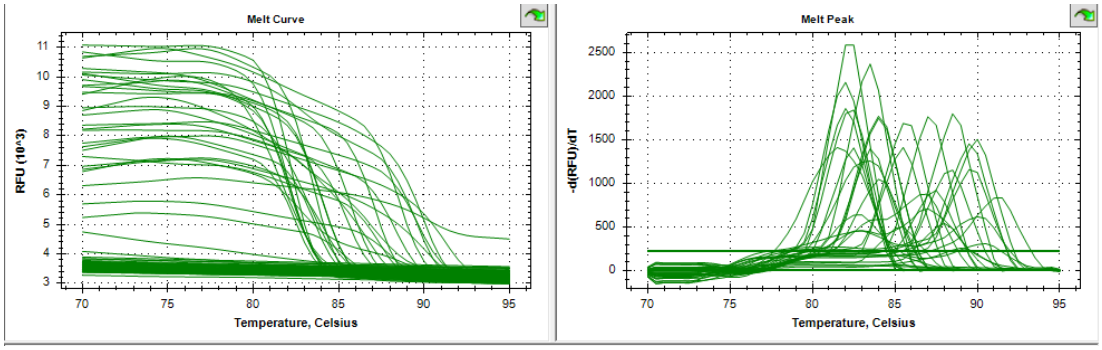
Tablo 15: Örneklerin RNA konsantrasyon sonuçları.

Örnek	RNA Konsantrasyonu ng/µl
1	4,62 ng/µl
2	1,15 ng/µl
3	0,575 ng/µl
4	2,2 ng/µl
5	6,91 ng/µl
6	1,67 ng/µl

6.2. Primer Doğrulaması

Primerlerin çalışıp çalışmadıkları bilgisayar ortamında doğrulandıktan sonra, genomik DNA kullanılarak kurulan reaksiyon ile denenmiştir. Genomik DNA kullanılarak primer doğrulama işlemi bazı primer çiftleri için iki defa tekrarlanmıştır. Elde edilen pikler ve sonuçlar tüm primerlerin çalıştığını göstermiştir (Şekil 12).



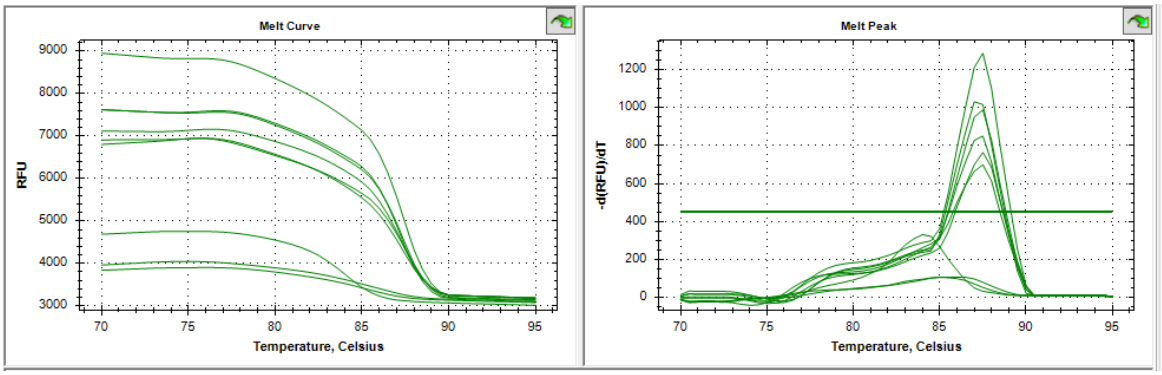


Şekil 12: Primer doğrulaması.

6.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Sonuçları

Periferal kan örneklerinden elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildikten sonra gerçek zamanlı kantitatif PZR ile analiz edilerek göreceli kantitasyon yöntemiyle değerlendirildi.

Tüm gen bölgeleri ve hastalar incelenmeden önce negatif kontrol ve pozitif kontrollerle yapılan analiz RNA izolasyonu sırasında DNA kontaminasyonu olmadığını ve aynı zamana cDNA'ların başarıyla elde edildiğini göstermiştir (Şekil 13).



Şekil 13: Negatif ve pozitif kontrollerin erime sıcaklığı eğrisi ve pikleri.

Negatif ve pozitif kontrollerden elde edilen sonuçlardan sonra, beş hasta ve bir sağlıklı bireyin (ikiz AS) analizi yapıldı. Housekeeping olarak kullanılan GAPDH ile normalizasyon yapıldı. $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri ile üç farklı analiz yapıldı. İlk analizde sağlıklı ikiz ve hasta ikiz (hafif

hasta) karşılaştırıldı (Tablo 16). İkinci analizde hastalar ve sağlıklı ikiz karşılaştırıldı (Tablo 17 ve Tablo 18). Son analizde ise ağır hastalar ile hafif hastalar karşılaştırıldı (Tablo 19). Hastalara ait erime eğrileri ve pikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 14).

Tablo 16: Hasta ve sağlıklı ikizin $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri (80 numaralı hedef housekeeping gen).

Hedef Gen	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$
1	1,42	**21**	2,03	**41**	1,24	**61**	1,53
2	1,58	**22**	1,09	**42**	1,62	**62**	1,15
3	0,79	**23**	1,87	**43**	1,49	**63**	1,69
4	1,07	**24**	1,19	**44**	1,18	**64**	1,44
5	1,74	**25**	1,03	**45**	1,28	**65**	3,72
6	0,70	**26**	1,18	**46**	1,19	**66**	1,54
7	1,20	**27**	1,11	**47**	1,07	**67**	1,10
8	-	**28**	0,74	**48**	-	**68**	0,95
9	2,01	**29**	1,36	**49**	1,44	**69**	1,89
10	1,00	**30**	1,16	**50**	0,71	**70**	1,42
11	0,53	**31**	1,31	**51**	1,64	**71**	1,69
12	0,17	**32**	1,14	**52**	1,40	**72**	0,95
13	1,51	**33**	2,20	**53**	1,37	**73**	1,01
14	1,52	**34**	0,42	**54**	1,21	**74**	-

15	1,77	**35**	1,26	**55**	1,43	**75**	0,37
16	1,07	**36**	1,74	**56**	0,94	**76**	0,34
17	1,33	**37**	1,14	**57**	0,48	**77**	0,82
18	2,28	**38**	-	**58**	0,70	**78**	0,98
19	1,18	**39**	0,34	**59**	1,38	**80**	1,00
20	0,84	**40**	1,03	**60**	1,89		

Tablo 17: Ağır hastalar ve sağlıklı ikizin $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri (80 numaralı hedef housekeeping gen)(Ağır hastaların ortalama Ct değerleri baz alınarak hesaplanmıştır).

Hedef Gen	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$
1	1,46	**21**	4,53	**41**	0,48	**61**	0,80
2	1,19	**22**	1,38	**42**	0,68	**62**	0,41
3	-	**23**	0,89	**43**	0,09	**63**	1,59
4	0,95	**24**	1,20	**44**	0,25	**64**	1,02
5	0,68	**25**	1,92	**45**	1,31	**65**	-
6	-	**26**	0,15	**46**	0,79	**66**	0,10
7	-	**27**	0,49	**47**	0,47	**67**	0,70
8	-	**28**	1,40	**48**	-	**68**	0,20
9	-	**29**	1,04	**49**	2,86	**69**	1,38

10	1,13	**30**	2,25	**50**	0,20	**70**	2,79
11	-	**31**	1,62	**51**	1,48	**71**	0,74
12	0,03	**32**	1,32	**52**	0,53	**72**	0,64
13	0,57	**33**	0,76	**53**	2,06	**73**	2,15
14	1,34	**34**	1,00	**54**	0,62	**74**	-
15	0,33	**35**	1,73	**55**	0,83	**75**	11,17
16	1,63	**36**	1,08	**56**	1,21	**76**	1,93
17	1,68	**37**	1,54	**57**	1,05	**77**	1,41
18	0,62	**38**	-	**58**	0,47	**78**	1,75
19	0,19	**39**	0,17	**59**	1,74	**80**	1,00
20	0,32	**40**	-	**60**	0,26		

Tablo 18: Hafif hastalar ve sağlıklı ikizin $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri (80 numaralı hedef housekeeping gen)(Hafif hastaların ortalama Ct değerleri baz alınarak hesaplanmıştır).

Hedef Gen	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$
1	3,66	**21**	12,93	**41**	0,47	**61**	1,06
2	2,75	**22**	3,82	**42**	1,24	**62**	1,47
3	-	**23**	2,1	**43**	0,35	**63**	6,67
4	1,75	**24**	3,41	**44**	1,63	**64**	2,06

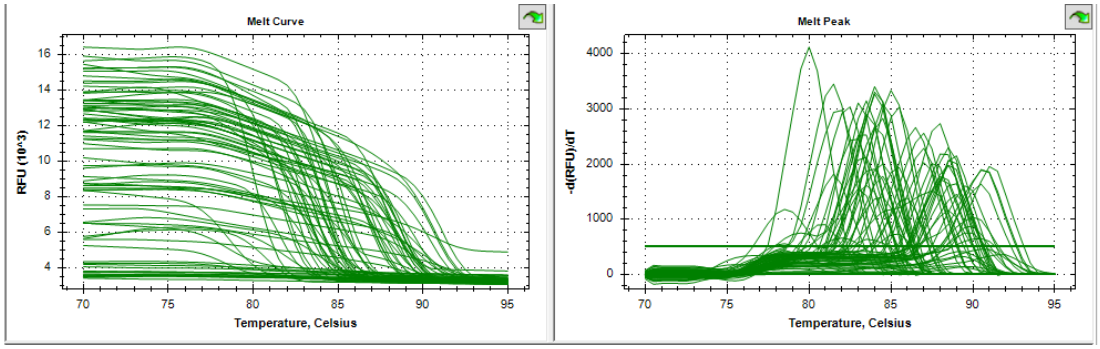
5	3,43	**25**	5,24	**45**	3,85	**65**	-
6	-	**26**	1,27	**46**	1,03	**66**	0,64
7	-	**27**	0,73	**47**	1,47	**67**	1,37
8	-	**28**	2,38	**48**	-	**68**	0,42
9	-	**29**	6,13	**49**	7,66	**69**	5,08
10	3,84	**30**	4,63	**50**	0,44	**70**	5,7
11	-	**31**	4,16	**51**	1,76	**71**	1,12
12	0,01	**32**	2,53	**52**	0,54	**72**	1,9
13	0,72	**33**	1,5	**53**	5,76	**73**	3,64
14	4,64	**34**	1,69	**54**	0,53	**74**	-
15	0,81	**35**	3,26	**55**	0,72	**75**	3,18
16	3,29	**36**	2,4	**56**	3,02	**76**	3,82
17	3,81	**37**	3,08	**57**	1,61	**77**	2,41
18	1,05	**38**	-	**58**	1,75	**78**	2
19	0,92	**39**	0,37	**59**	3,72	**80**	1
20	1,09	**40**	-	**60**	0,81		

Tablo 19: Ağır hastalar ve hafif hastaların $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak elde edilen ekspresyon düzeyleri (80 numaralı hedef housekeeping gen)(Ağır ve hafif hastaların ortalama Ct değerleri baz alınarak hesaplanmıştır).

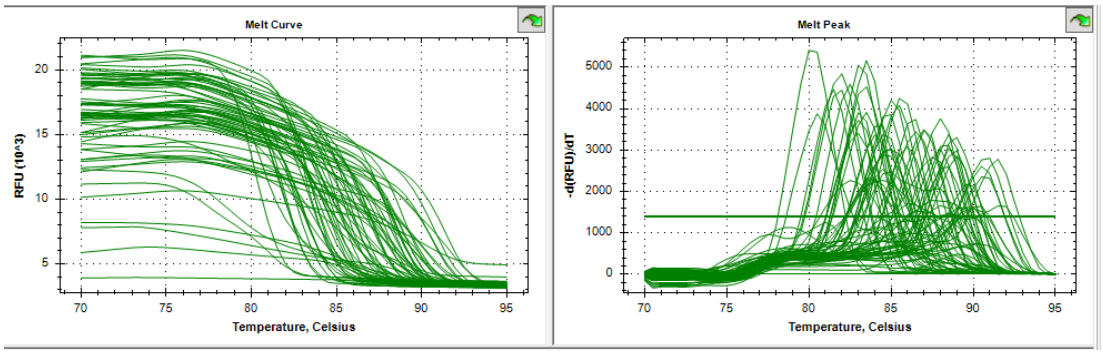
Hedef Gen	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$	**Hedef Gen**	$2^{-}\Delta\Delta Ct$
1	2,51	**21**	0,35	**41**	1,03	**61**	0,75
2	0,43	**22**	0,36	**42**	0,55	**62**	0,28
3	0,62	**23**	0,42	**43**	0,26	**63**	0,24
4	0,54	**24**	0,35	**44**	0,15	**64**	0,5
5	0,2	**25**	0,37	**45**	0,34	**65**	0,25
6	-	**26**	0,12	**46**	0,77	**66**	0,07
7	0,19	**27**	0,66	**47**	0,32	**67**	0,51
8	-	**28**	0,59	**48**	-	**68**	0,48
9	1,32	**29**	0,17	**49**	0,37	**69**	0,27
10	0,29	**30**	0,49	**50**	0,45	**70**	0,49
11	0,12	**31**	0,39	**51**	0,62	**71**	0,66
12	2,68	**32**	0,52	**52**	0,98	**72**	0,33
13	0,78	**33**	0,5	**53**	0,36	**73**	0,59
14	0,29	**34**	0,59	**54**	1,17	**74**	12,64
15	0,41	**35**	0,53	**55**	1,16	**75**	0,55
16	0,35	**36**	0,45	**56**	0,4	**76**	0,51

17	0,44	**37**	0,5	**57**	0,66	**77**	0,59
18	0,59	**38**	-	**58**	0,27	**78**	0,88
19	0,21	**39**	0,47	**59**	0,47	**80**	1
20	0,3	**40**	0,19	**60**	0,33		

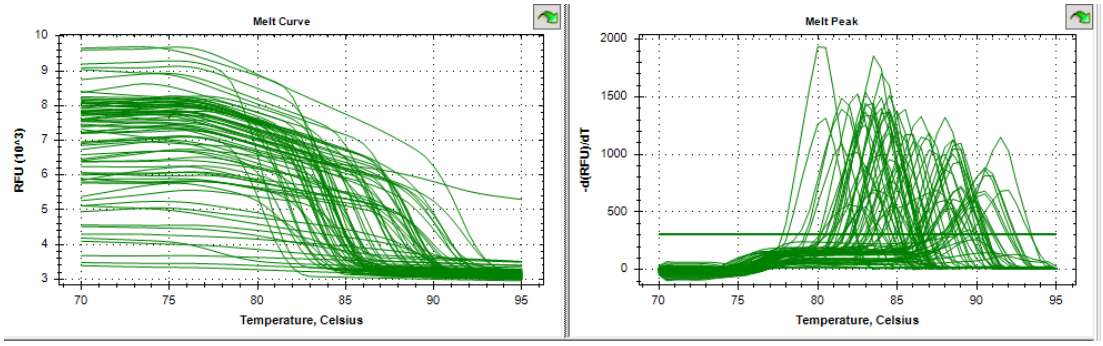
a.



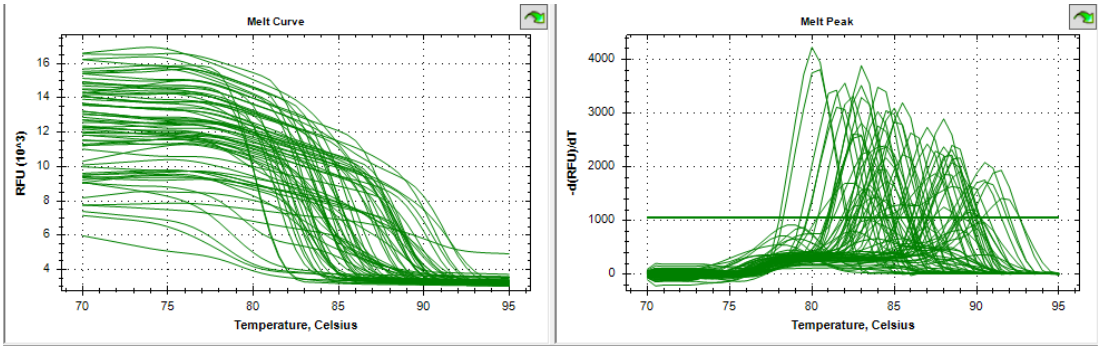
b.



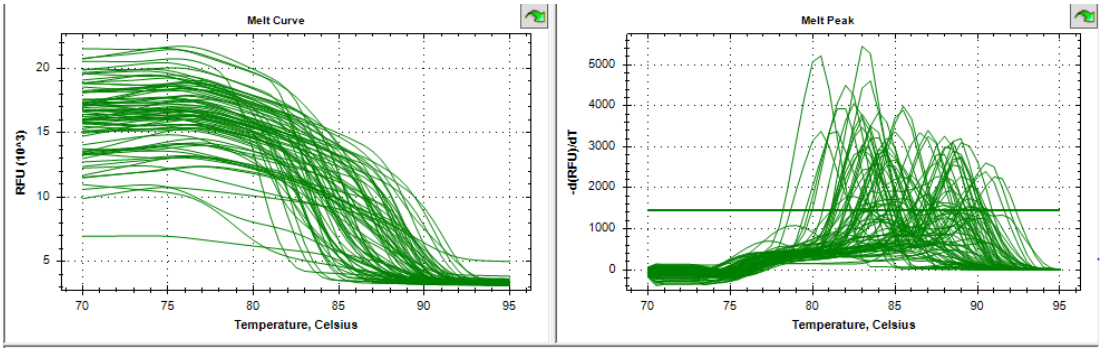
c.



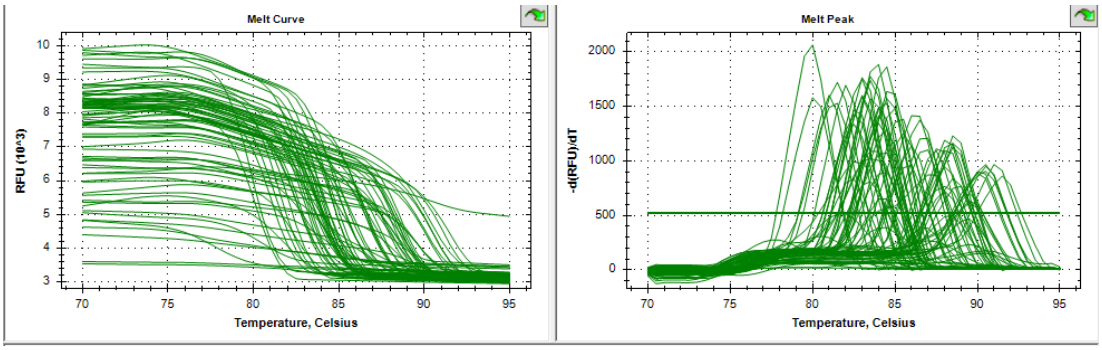
d.


Melt Curve
RFU (10^3)
Temperature, Celsius
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

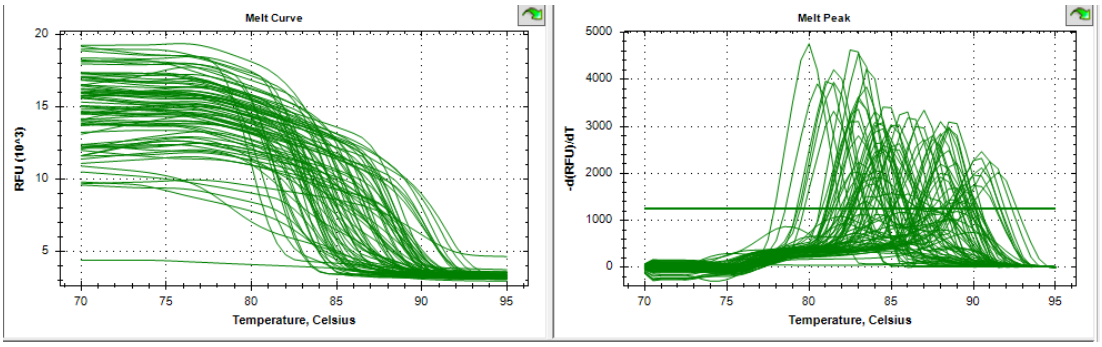
e.


Melt Curve
RFU (10^3)
Temperature, Celsius
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

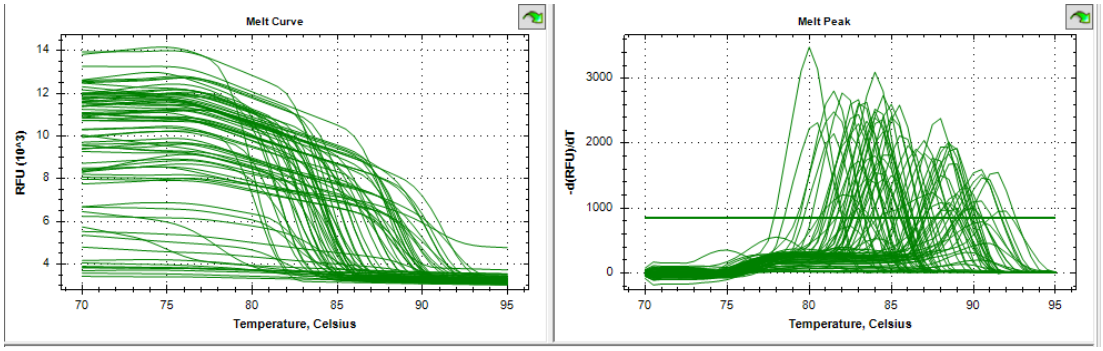
f.


Melt Curve
RFU (10^3)
Temperature, Celsius
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

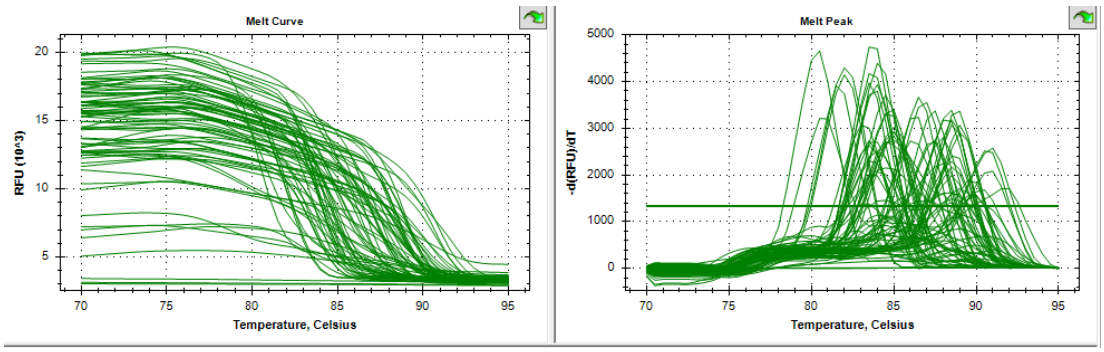
g.


Melt Curve
RFU (10^3)
Temperature, Celsius
Melt Peak
-d(RFU)/dT
Temperature, Celsius

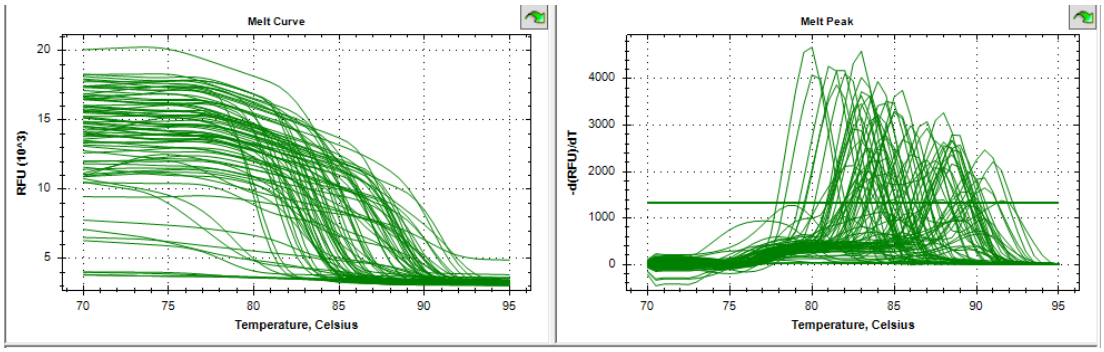
h.



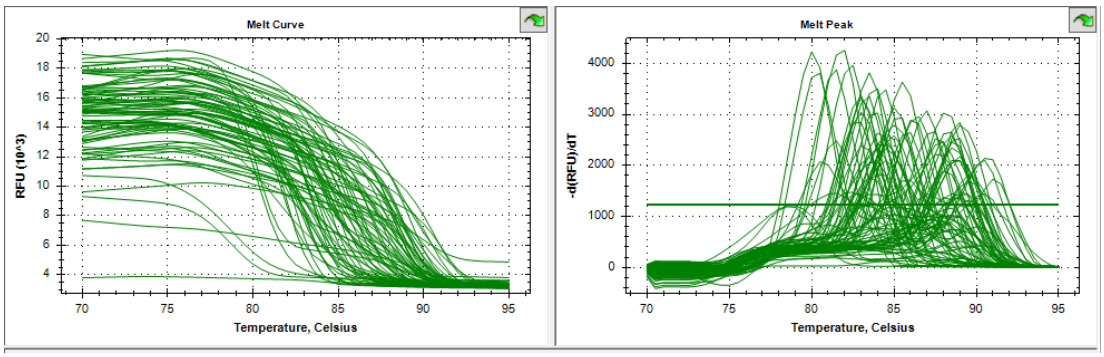
i.



j.



k.



Şekil 14: Hastaların ve sağlıklı bireyin erime sıcaklığı eğrileri ve erime pikleri: a-b; 6 numaralı hasta, c; 1 numaralı hasta, d-e; 2 numaralı hasta, f-g; 4 numaralı hasta, h-i; 5 numaralı hasta, j-k; 3 numaralı sağlıklı ikiz. Farklı hastaların aynı gen bölgelerinin erime sıcaklığı eğrileri tek tek incelendiğinde, aynı sıcaklıklarda pik verdiği görüldü. Bu durum RT- PZR'nun başarılı ve spesifik olduğunu göstermektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, artirit gelişimi ve romatoid artiritin patogeneziyle ilişkisi olduğu rapor edilen epigenetik modifiye edicilerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin Ankilozan Spondilit ile ilişkisini saptamak amacıyla yapıldı. Bu amaç doğrultusunda çalışmada diskordant monozigotik ikizler (hasta olan ikiz hafif hasta grubunda) ile hastalığın radyolojik skorlamasına göre ağır ve hafif grup olarak klinikte tanımlanan iki grup hasta (2 ağır ve 3 hafif) ve 1 sağlıklı birey (sağlıklı ikiz) kullanıldı. Diskordant monozigotik ikiz kullanıldığı ve ikizlerin genetik yapılarının birebir aynı olduğu göz önüne alındığı için az sayıda örnekle çalışmayı sunmak epigenetik değişikliklerin gösterilmesi açısından anlamlı sonuçlar elde edileceğini düşündürdü. Aynı zamanda radyolojik skorlama sonucu klinik tanımlamayla ağır hasta-hafif hasta ayrımının net şekilde yapılabilmesi hasta gruplarındaki çalışılan örnek sayısının da yeterli olduğunu düşündürdü. Tüm bu bileşenler göz önüne alınarak az sayıda örnekle çok sayıda gen taranarak hastalıkta epigenetik katkı incelendi.

SpA hastalık grubunda yer alan AS'nin nedeni tam olarak bilinmemektedir ancak genetik ve çevresel faktörlerin her ikisinin de hastalığın patogenezinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (E.B Gouveia ve ark., 2012). Genetik faktörlerin AS'nin gelişiminde tek belirleyici olmamasına rağmen büyük ölçüde ilişkili olduğu rapor edilmiştir (S. Brophy ve ark., 2004). Monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılan çalışmalar hastalığın büyük ölçüde kalıtsal olduğu ancak bununla beraber çevresel tetikleyicilerin de yaygın olabileceğini düşündürmektedir (MA. Brown ve ark., 1997). Otoimmün enflamatuvar bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozus (SLE) için diskordant olan monozigotik ikizlerle yapılan bir çalışmada, hasta ve sağlıklı kardeşler karşılaştırılmış ve hasta kardeşlerde global DNA hipometilasyonu tespit edilmiştir (BM. Javierre ve ark. 2010).

Çalışmada gerçek zamanlı kantitatif PZR ile ekspresyon ölçümü sonrasında elde edilen veriler $2^{-}\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda sağlıklı ikiz- hasta ikiz, ağır hasta-sağlıklı ikiz, hafif hasta-sağlıklı ikiz ve ağır hasta-hafif hasta karşılaştırmaları yapılmıştır. Çalışılan örnekler kendi içinde GAPDH

housekeeping gen ile hastalar ise kendi aralarında sağlıklı birey kullanılarak normalize edildi. GAPDH birçok ekspresyon çalışmasında iç kontrol olarak kullanılan housekeeping gen olduğu için bizim çalışmamız için de iç kontrol olarak seçilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013; QZ. Sun ve ark., 2010). Aynı zamanda 72 insan dokusu kullanılarak GAPDH'ın ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada, GAPDH'ın ekspresyon çalışmalarında iyi bir iç kontrol olduğu rapor edilmiştir (RD. Barber ve ark., 2005).

Sağlıklı ikiz-hasta ikiz karşılaştırılması yapıldığında; hasta ikizde beş genin (PRMT6, SUV420H1, SETD7, NCOA3, KAT2B) ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre arttığı ($R \geq 2$), yedi genin ekspresyonlarının ise (SMYD3, NEK6, RPS6KA5, KDM6B, MLL, PRMT3, DNMT1) sağlıklı ikize göre azaldığı ($R \leq 0,6$) tespit edilmiştir.

Lysine N-Methyltransferase 5B (SUV420H1)'nin otoimmün hastalıklarla ya da hemotolojik kanserlerle bağlantılı olduğunu düşündüren çalışmalar rapor edilmiştir. Bunun yanında SUV420H1 ve *SET And MYND Domain Containing 3* (SEMYD3)'de meydana gelen değişimlerin meme kanseriyle ilişkili olduğu ve tedavi için kullanılabileceği düşünülmektedir (L. Liu ve ark., 2015; G. Lauc ve ark., 2013). T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olan Aropesi areata hastalarında yapılan bir çalışmada *SET Domain Containing (Lysine Methyltransferase) 7* (SETD7)'nin, artmış ekspresyonu gözlenmiştir. Aynı çalışma bizim verilerimizin aksine *Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A* (MLL)'nın da artmış ekspresyonunu rapor etmiştir. Elde ettiğimiz verilerde SETD7'nin ekspresyonunda sağlıklı ikize göre artış gözlenirken MLL'nin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (M. Zhao ve ark., 2012). *Nuclear Receptor Coactivator 3* (NCOA3)'ün çeşitli kanser türleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (http://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=NCOA3&keywords=NCOA3 Erişim tarihi: 21 Mayıs 2015). *K(Lysine) Acetyltransferase 2B* (KAT2B)'nin ise virüs enfeksiyonu, meme kanseri, prostat kanseri, lösemi ile ilişkilendirilmiştir (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KAT2B&keywords=KAT2B Erişim tarihi: 21 Mayıs 2015).

Ekspresyonu sağlıklı ikize göre azalmış olan ve çeşitli kanser türleriyle ilişkisi olduğu düşünülen *Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 5* (RPS6KA5)'in enflamasyonla direk bağlantısı olduğunu gösteren hücre kültür çalışması literatürde gösterilmiştir (L. Reber ve ark., 2009).

Ankilozan spondilit ile benzer özelliklere sahip olan sistemik lupus eritamatozus ve DNMT1 arasındaki ilişkinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur. Sistemik lupus eritamatozuslu hastalar ve sağlıklı kontroller kullanılarak yapılan bir çalışmada hastalarda metilasyon seviyesinin ve DNMT1 ekspresyon seviyesinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı tespit edilmiştir (JJ. Zhou ve ark., 2013). Benzer şekilde yine sistemik lupus eritamatozuslu hastalar ve sağlıklı kontrollerle yapılan başka bir çalışmada hastalarda global hipometilasyon ve DNMT1 ekspresyon seviyesinde sağlıklı kontrollere göre azalma tespit edildiği rapor edilmiştir (X. Zhu ve ark., 2011). Yapılan çalışma ve hesaplamalar sonucunda elde edilen verilerde, hasta ikizde sağlıklıya göre DNMT1'in azalmış ekspresyonu literatürde daha önceden gösterilen verilerle paralellik göstermiştir.

Hafif hasta-sağlıklı ikiz karşılaştırılmasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında otuz dört genin (AURKA, CDYL, PRMT6, ASH1L, SETD2, NSD1,SETD8, SETD5, DOT1L, AURKB, ESCO1, HDAC5, HDAC11, PRMT8, HDAC8, WHSC1, DNMT3B, MBD3, CSRP2BP, KAT5, KDM4A, MYST3, HDAC9, PRMT7, PRMT3, AURKC, MLL3, MECP2, SMYD3, CIITA, SETD3, SETD1A, SETD6, MYST2) ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre arttığı ($R \geq 2$), sekiz genin (HDAC1, CTCF, HDAC3, MLL5, KDM6B, PAK1, HDAC2, NEK6) ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre azaldığı ($R \leq 0,6$) tespit edilmiştir. *Aurora Kinase A* (AURKA) ve *Histone Deacetylase 11* (HDAC11) genlerinin romatoid artiritli hastalarda da sağlıklı kontrollere göre ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013). SETD1B, SETDB1, PRMT1 genlerinin hafif hastalarda ağır hastalarda olduğu gibi eksprese olmadığı tespit edilmiştir.

Ağır hasta- sağlıklı ikiz karşılaştırılması yapılan analiz sonucunda, yedi adet genin (PRMT6, PRMT8, DNMT3B, MBD3, KDM4A, MYST3, PRMT3) ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre arttığı ($R \geq 2$), on yedi adet genin (HDAC1,

SETDB2, CTCF, DNMT3A, KDM5B, RPS6KA3, MBD2, NCOA6, HDAC3, KDM5A, MLL5, KDM6B, MBD4, ESCO2, NCOA1, NEK6, EHMT2) ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre azaldığı (R≤0,6) tespit edilmiştir. Bunların yanında dört adet genin (PRMT5, SETD1B, SETDB1, PRMT1) ağır hastalarda eksprese olmadığı tespit edilmiştir. Metile olmamış CpG dinükleotidlerini metilleyerek de novo (baştan, yeniden) metilasyonu sağlayan ve gelişimin farklı evrelerinde görev alan DNMT3A ve DNMT3B'nin ekspresyon seviyelerinin sistemik lupus eritamatozuslu hastalarda incelendiği bir çalışmada hasta ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı fark bulunamamıştır (X. Zhu ve ark., 2011; M.Okano ve ark., 1999). Bu nedenle DNMT3A ve DNMT3B için elde ettiğimiz sonuçların anlamlı olabilmesi için daha büyük bir hasta grubuyla tekrar çalışılması gerekmektedir. Literatürde *SET Domain, Bifurcated 2* (SETDB2)'nin romatoid artiritli hastalarda ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir şekilde azaldığının tespit edildiği çalışma mevcuttur (TT. Glant ve ark., 2013). Elde ettiğimiz veriler bu çalışmayla paralellik göstermektedir. *Lysine (K)-Specific Demethylase 5B* (KDM5B)'nin mide kanserinde sağlıklı kontrollere göre ekspresyonunun arttığı ve mide kanserinin tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Z. Wang ve ark., 2015). AS ile ilişkisinin gösterildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada sağlıklı ikize göre ekspresyonlarının azaldığı tespit edilen *Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2* (EHMT2) ve *Lysine (K)-Specific Demethylase 5A* (KDM5A)'nın Aropesi areata hastalarında sağlıklı kontollere göre ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (M. Zhao ve ark., 2012). Romatoidli hastalarda kontrollere göre artmış ekspresyonu rapor edilen *Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2* (ESCO2)'nin bizim bulgularımızda sağlıklıya göre azalmış ekspresyonu gözlendi. Aynı çalışmada enflamatuvar yolakları etkileyen ve epigenetik sinyalleri baskılayan *Lysine (K)-Specific Demethylase 6B* (KDM6B)'nin ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir şekilde arttığı rapor edilmiştir. Bizim bulgularımızda KDM6B'nin ekspresyonunun hasta bireylerde arttığı gözlenmiştir. AS ile ilişkisi bulunan yolakları etkilediği düşünülen bu genin ekspresyonuna daha büyük bir hasta grubunda tekrar incelenmesi düşünülebilir (TT. Glant ve ark. 2013).

Üç analiz sonucu karşılaştırıldığında (hasta ikiz-sağlıklı ikiz, ağır hasta-sağlıklı ikiz, hafif hasta-sağlıklı ikiz) elde edilen verilere göre Protein Arjinin Metiltransferaz (PRMT6) geninin her üç analizde de sağlıklı ikize göre artmış ekspresyonu tespit edildi. Metiltransferaz olan PRMT6 daha önce kalpte hızlı kalp atımına (taşikardi) neden olabilecek şekilde ekstra bir elektriksel yol gelişen bir doğumsal kusur olan *Wolff Parkinson White Sendrome* ile ilişkilendirilmiştir. Romatoid artiritli hastalarla yapılan bir çalışmada sağlıklı kontrollere göre yüksek ekspresyonu rapor edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013). Literatürde ankilozan spondilitle ilişkilendirildiğine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Lizin Spesifik Demetilaz 6B (KDM6B) ve *NIMA (Never In Mitosis Gene A)-Related Kinase 6* (NEK6) genlerin ise her üç analiz sonucunda sağlıklı ikize göre azalmış ekspresyonu tespit edildi. NEK6 kas güçsüzlüğü ve zayıflamasına neden olan Miyotonik Distrofi ile ilişkilendirilmiştir. Romatoid artirit hastalarıyla yapılan çalışmada bulgularımızın aksine NEK6 ve KDM6B 'nın hastalarda artmış ekspresyonu rapor edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013).

SETD1B, SETDB1, PRMT1 genlerinin ise hem ağır hem de hafif hastalarda ekspresyonunun olmadığı tespit edilmiştir. Protein Arjinin Metiltransferaz 1 (PRMT1) Hepatit C ve çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin akciğer kanserinde epitelyal mezankimal geçişte, metastazda ve invazyonda regülatör olarak görev yaptığı, meme kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (S. Avasarala ve ark., 2015; K. Mathioudaki ve ark., 2011). Bunun yanında astımlı farelerde yapılan bir çalışmada ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre arttığı rapor edilmiştir (QZ. Sun ve ark., 2010). *SET Domain Containing 1B* (SETD1B)'de meydana gelen değişimlerin meme kanseriyle ilişkili olduğu ve tedavi için kullanılabileceği düşünülmektedir (L. Liu ve ark., 2015). *SET Domain, Bifurcated 1*(SETDB1) ise Hungtinton hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

Hasta gruplarının sağlıklı ikizle karşılaştırıldığı verilere bakıldığında PRMT6 hariç altı adet genin (PRMT8, DNMT3B, MBD3, KDM4A, MYST3, PRMT3) her iki analiz sonucunda da (ağır hasta-sağlıklı ikiz, hafif hasta-sağlıklı ikiz) hastalarda artmış ekspresyonları tespit edildi. Protein Arjinin Metiltransferaz 8 (PRMT8) genç

sinir hücrelerinde oluşan periferal primitif nöroektodermal tümör ile ilişkilendirilmiştir. DNMT3B geni daha önce de anlatıldığı üzere metilasyonu katalizleyen enzim ailesi grubundadır ve erken embriyonik dönemde işlev görür. *Methyl-CpG Binding Domain Protein 3* (MBD3) kromatin yeniden düzenleyen proteinlerdendir. Subakut kutanöz lupus eritematozus ile ilişkilendirilmiştir. Aropesi areata hastalarıyla yapılan çalışmada bulgularımızın aksine Lizin Spesifik Demetilaz 4A (KDM4A)'nın ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre azaldığı tespit edilmiştir (M. Zhao ve ark., 2012). Lizin Asetiltransferaz 6A (MYST3) lösemi ile ilişkilendirilmiştir ancak ankilozan spondilit ile ilişkisi bulunduğuna dair çalışmaya rastlanılmamıştır. Kronik enflamatuvar bir hastalık olan astımlı farelerde yapılan bir çalışmada Protein Arjinin Metiltransferaz 3 (PRMT3) geninin ekspresyonunun bizim bulgularımızla paralellik göstererek anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (QZ. Sun ve ark., 2010). PRMT3 yalnızca hasta ikiz-sağlıklı ikiz karşılaştırılmasında hasta ikizde azaldığı tespit edilmiştir.

Bunların yanında HDAC1, CTCF, HDAC3 ve MLL5 genlerin ekspresyonunun hasta gruplarında sağlıklı ikize göre azaldığı tespit edilmiştir. HDAC1 çeşitli kanserle ilişkilendirilmesinin yanı sıra ankilozan spondilit, sistemik lupus eritamatozus, romatoid artirit gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Romatoid artiritli hastalarla yapılan bir çalışmada HDAC1'in mRNA ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu rapor edilmiştir (T. Kawabata ve ark., 2010). Ancak elde ettiğimiz sonuçlarda HDAC1'in ekspresyon seviyesinin hasta gruplarında sağlıklı ikize göre azaldığı tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlarla da paralel olarak HDAC3'ün benzer özelliklere sahip bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozuslu hastalarda sağlıklı kontrollere göre ekspresyon seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir (YT. Leung ve ark., 2015). *Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2E* (MLL5) geni ise lösemi ile ilişkilendirilmiştir. CCCTC-*Binding Factor (Zinc Finger Protein)* (CTCF) nöronal bir hastalık olan *Mental Retardation, Autosomal Dominant 21* ile ilişkilendirilmiştir. MLL5 ve CTCF genlerinin ankilozan spondilit ile ilişkisinin görüldüğü bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Hasta gruplarının (ağır hasta-hafif hasta) karşılaştırılmasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında KDM6B, *Aurora Kinase A* (AURKA) ve *Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1* (CARM1) genlerinin ağır hasta grubunda ekspresyonunun hafif hasta grubuna göre artmış olduğu tespit edildi. Artiritli farelerle yapılan bir çalışmada AURKA'nın artiritli farelerde normal farelere göre ekspresyonunun arttığı ve AURKA'nın RA tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olduğu rapor edilmiştir (TT. Glant ve ark., 2013). CARM1 'in SWI/SNF kromatin yeniden düzenleme kompleksinin alt ünitelerini metilleyerek meme kanserinin ilerlemesini ve metastazı arttırdığı rapor edilmiştir (X. Wang & CW. Roberts, 2014). Bunun yanında CARM1'in embriyogenez sırasında kıkırdak hücrelerinin çoğalmasında düzenleyici olarak rol aldığı gösterilmiştir (T. Ito ve ark., 2009). Elde edilen sonuçlara göre paneldeki bu üç gen dışındaki çok sayıda genin ekspresyon seviyesinin ağır hastalarda hafif hasta grubuna göre düşük olduğu tespit edildi. Ancak ekspresyonu düşük olan genler arasında aday olarak nitelendirilecek genlerin tespit edilebilmesi için hasta gruplarındaki kişi sayısının ve sağlıklı kontrolün sayısının arttırılarak çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir.

Yapılan çalışmada daha önce de belirtildiği üzere çok sayıda gen taranmış olmasına rağmen düşük sayıda hasta kullanıldı ve bazı hastaların ekspresyon ölçümleri bir defa çalışıldı. Daha verimli sonuçların alınabilmesi için daha fazla örnek sayısı ile çalışılmalıdır. Örnek sayısının arttırılmasının ardından elde edilen verilerin anlamlı olup olmadığı istatistiki testler yardımıyla bakılmalıdır. Aynı zamanda örnekler iki ya da daha fazla tekrarlar halinde çalışılarak ekspresyon ölçümlerinin ortalamasıyla hesaplamalar yapılmalıdır. Bunun yanında kontrol olarak sadece bir sağlıklı bireyin kullanılmış olması ve toplumda görülme sıklığı %0,1-%1,4 arasında değişen AS için monozigotik diskordant ikiz bulma olasılığının çok düşük olması nedeniyle çalışmaya dahil edilen ikiz sayımızın bir olması en büyük kısıtlayıcılarımızdan olmuştur.

Kısıtlayıcılarımızın olmasının yanı sıra çalışmamızda AS için aynı anda çok sayıda gen incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, hasta ikiz-sağlıklı ikiz, ağır hasta-sağlıklı ikiz, hafif hasta-sağlıklı ikiz karşılaştırmaları sonucunda NEK6,

PRMT6 ve KDM6B'nın ekspresyonlarında farklılık tespit edilmiştir. İkiz karşılaştırılması sonucunda SETD7'nin hasta ikizde sağlıklı ikize göre artmış ekspresyonu tespit edilmiştir. Aynı zamanda SETD7'nin T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olan Aropesi areata hastalarında da artmış ekspresyonu rapor edilmiştir. Subakut kutanöz lupus eritematozus ile ilişkilendirilmiş MBD3'ün hasta gruplarında sağlıklı bireye göre ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. AS, RA gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiş HDAC1'in hasta gruplarında sağlıklıya göre ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Otoimmün bir hastalık olan Aropesi areata hastalarında azalmış ekspresyonu rapor edilen KDM4A'nın hasta gruplarında sağlıklı bireye göre artmış ekspresyonu tespit edilmiştir. AURKA ve CARM1 genlerinin ekspresyonları ağır hasta grubunda hafif hasta grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Bu iki genin de ağır hasta-hafif hasta farkı için önemli olabileceği düşünülmektedir. Sağlıklı ikiz-hasta ikiz karşılaştırılması yapıldığında; hasta ikizde SUV420H1, NCOA3, KAT2B genlerinin ekspresyonlarının sağlıklı ikize göre arttığı, SMYD3, RPS6KA5, MLL, PRMT3, DNMT1 ekspresyonlarının ise sağlıklı ikize göre azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle hasta ikiz-sağlıklı ikiz farkının hastalıkta epigenetik değişikliklerin katkısının anlaşılabilmesi için yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Ekspresyon değişiklikleri tespit edilen bu kodlayan bölgelerle beraber hasta gruplarında eksprese olmadığı tespit edilen SETD1B, SETDB1 ve PRMT1'in ekspresyonunun daha büyük bir ağır ve hafif hasta grubunda karşılaştırmalı olarak çalışılması planlanmıştır. Temel amaç uygun doku ve moleküllerle çalışılarak AS'nin patogenezine katkıda bulunan ve aynı zamanda benzer patolojik özellikler gösteren hastalıklarda epigenetik destekleyicilerin tespit edilmesidir.

8. KAYNAKLAR

Absher, D.M., Li, X., Waite, L.L., Gibson, A., Roberts, K., Edberg, J., Chatham, W.W., Kimberly, R.P., 2013. Genome-
wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomet hylation ofinterferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. PLoS Genet., 9(8), pp. e1003678.

Akgul, O., Ozgocmen, S., 2011. Classification criteria for spondyloarthropathies. World J. Orthop., 2(12), pp.107-15.

Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. Nat. Genet., 42(2), pp. 123-7.

Avasarala, S., Van Scoyk, M., Karuppusamy Rathinam, M.K., Zerayesus, S., Zhao, X., Zhang, W., Pergande, M.R., Borgia, J.A., DeGregori, J., Port, J.D., Winn, R.A.,Bikkavilli, R.K., 2015. PRMT1 Is a Novel Regulator of Epithelial-Mesenchymal-Transition in Non-small Cell Lung Cancer. J. Biol. Chem., 290(21), pp. 13479-89.

Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol. Genomics, 21(3), pp. 389-95.

Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics., 21(3), pp. 389-95.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T., Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M., Millar, S., Hannon, G., Blasco, M.A., 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2- dependent regulation of DNA methyltransferases. Nat. Struct. Mol. Biol., 15(9), pp. 998.

Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature, 447(7143), pp. 407-12.

Biegel, J.A., Busse, T.M., Weissman, B.E., 2014. SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer. Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet., 166C(3), pp. 350-66.

Boonen, A., Severens, J.L., 2002. Ankylosing spondylitis: what is the cost to society, and can it be reduced? Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 16(4), pp. 691-705.

Braun, J., Sieper, J., 2007. Ankylosing spondylitis. Lancet, 369(9570), pp. 1379-90.

Braun, J., Landewé, R., Hermann, K.G., Han, J., Yan, S., Williamson, P., van der Heijde, D., ASSERT Study Group, 2006. Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled magnetic resonance imaging study. Arthritis Rheum., 54(5), pp. 1646-52.

Briggs, S.D., Xiao, T., Sun, Z.W., Caldwell, J.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., Strahl, B.D., 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. Nature., 418(6897), 498.

Brophy, S., Hickey, S., Menon, A., Taylor, G., Bradbury, L., Hamersma, J., Calin, A., 2004. Concordance of disease severity among family members with ankylosing spondylitis? J. Rheumatol., 31(9), pp. 1775-8.

Brown, M.A., Kennedy, L.G., MacGregor, A.J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J.L., Taylor, A., Calin, A., Wordsworth, P., 1997. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. Arthritis. Rheum., 40(10), pp. 1823-8.

Brown, M.A., Pile, K.D., Kennedy, L.G., Calin, A., Darke, C., Bell, J., Wordsworth, B.P., Cornélis, F., 1996. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. Ann. Rheum. Dis., 55(4), pp. 268-70.

Brown, M.A., Wordsworth, B.P., Reveille, J.D., 2002. Genetics of ankylosing spondylitis. Clin. Exp. Rheumatol., 20(6 Suppl 28), pp. 43-9.

Calin, A., Marder, A., Becks, E., Burns, T., 1983. Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls. Arthritis Rheum., 26(12), pp. 1460-4.

Carrió, E., Suelves, M., 2015. DNA methylation dynamics in muscle development and disease. Front Aging Neurosci., 5;7:19.

Carter, S., Braem, K., Lories, R.J., 2012. The role of bone morphogenetic proteins in ankylosing spondylitis. Ther. Adv. Musculoskelet Dis., 4(4), pp. 293-9.

Chandramore, K., Ghaskadbi, S., 2011. Evo-devo: Hydra raises its Noggin. J. Biosci., 36(3), pp. 517-29.

Copeland, N.G., Silan, C.M., Kingsley, D.M., Jenkins, N.A., Cannizzaro, L.A., Croce, C.M., Huebner, K., Sims, J.E., 1991. Chromosomal location of murine and human IL-1 receptor genes. Genomics., 9(1), pp. 44-50.

Creemers, M.C., Franssen, M.J, van't Hof, M.A., Gribnau, F.W., van de Putte, L.B., van Riel, P.L., 2005. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. Ann. Rheum. Dis., 64(1), pp. 127-9.

Cui, X., Rouhani, F.N., Hawari, F., Levine, S.J., 2003. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. J. Immunol., 171(12), pp. 6814-9.

Davidson, S.I., Liu, Y., Danoy, P.A., Wu, X., Thomas, G.P., Jiang, L., Sun, L., Wang, N., Han, J., Han, H.; Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium, Visscher, P.M., Brown, M.A., Xu, H., 2011. Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese. Ann. Rheum. Dis., 70(2), pp. 289-92.

de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B., 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J., 370(Pt 3), pp. 737-49.

Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., van der Heide, D., Landewe, R., Lacey, D.,Richards, W.G., Schett, G., 2007. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat. Med., 13(2), pp. 156-63.

Dong, H., Li, Q., Zhang, Y., Tan, W., Jiang, Z., 2013. IL23R gene confers susceptibility to ankylosing spondylitis concomitant with uveitis in a Han Chinese population. PLoS One., 8(6), pp. e67505.

Dougados, M., Baeten, D., 2011. Spondyloarthritis. Lancet., 377(9783), pp. 2127-37.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T.,Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barmada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., Cho, J.H., 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science., 314(5804), pp. 1461-3.

Duggirala, A., Delogu, F., Angelini, T.G., Smith, T., Caputo, M., Rajakaruna, C., Emanueli, C., 2015. Non coding RNAs in aortic aneurysmal disease. Front Genet., 6, 125.

Dunne, A., O'Neill, L.A., 2003. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci. STKE., 2003(171), pp. re3.

Ebringer, A., Wilson, C., 2000. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. J.Med. Microbiol., 49(4), pp. 305-11.

Farazi, T.A., Juranek, S.A., Tuschl, T., 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. Development., 135(7), pp. 1201-14.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, 301(5895), pp. 89-92.

Feldtkeller, E., Khan, M.A., van der Heijde, D., van der Linden, S., Braun, J., 2003. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. Rheumatol. Int., 23(2), pp. 61-6.

Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., Khorasanizadeh, S., 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. Genes Dev., 17(15), pp. 1870-81.

Gallipoli, P., Giotopoulos, G., Huntly, B.J., 2015. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. Ther. Adv. Hematol., 6(3), pp. 103-19.

Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. J. Mol. Biol., 196(2), pp. 261-82.

Geijer, M., Gadeholt Göthlin, G., Göthlin, J.H., 2009. The validity of the New York radiological grading criteria in diagnosing sacroiliitis by computed tomography. Acta. Radiol., 50(6), pp. 664-73.

Gillespie, J., Savic, S., Wong, C., Hempshall, A., Inman, M., Emery, P., Grigg, R., McDermott, M.F., 2012. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritispatients. Arthritis Rheum., 64(2), pp. 418-22.

Glant, T.T., Besenyei, T., Kádár, A., Kurkó, J., Tryniszewska, B., Gál, J., Soós, G., Szekanecz, Z., Hoffmann, G., Block, J.A., Katz, R.S., Mikecz, K., Rauch, T.A., 2013. Arthritis Rheum., 65(7), pp. 1725-35.

Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., Walters, E.H., 2002. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. Thorax., 57(9), pp. 765-70.

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., Bestor, T.H., 2006. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science., 311(5759), pp. 395-8.

Goto, Y., Ogawa, K., Hattori, A., Tsujimoto, M., 2011. Secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 is involved in the activation of macrophages induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma. J. Biol. Chem., 286(24), pp. 21906-14.

Gouveia, E.B., Elmann, D., Morales, M.S., 2012. Ankylosing spondylitis and uveitis: overview. Rev. Bras. Reumatol., 52(5), pp. 742-56.

Hamilton, J.P., 2011. Epigenetics: principles and practice. Dig. Dis., 29(2), pp. 130-5.

Haroon, N., Tsui, F.W., Chiu, B., Tsui, H.W., Inman, R.D., 2010. Serum cytokine receptors in ankylosing spondylitis: relationship to inflammatory markers and endoplasmic reticulum aminopeptidase polymorphisms. J. Rheumatol., 37(9), pp. 1907-10.

Huerta-Sil, G., Casasola-Vargas, J.C., Londoño, J.D., Rivas-Ruíz, R., Chávez, J., Pacheco-Tena, C., Cardiel, M.H., Vargas-Alarcón, G., Burgos-Vargas, R., 2006. Low grade radiographic sacroiliitis as prognostic factor in patients with undifferentiated spondyloarthritis fulfilling diagnostic criteria for ankylosing spondylitis throughout follow up. Ann. Rheum. Dis., 65(5), pp. 642-6.

Ito, T., Yadav, N., Lee, J., Furumatsu, T., Yamashita, S., Yoshida, K., Taniguchi, N., Hashimoto, M., Tsuchiya, M., Ozaki, T., Lotz, M., Bedford, M.T., Asahara, H., 2009. Arginine methyltransferase CARM1/PRMT4 regulates endochondral ossification. BMC Dev. Biol., 9:47. doi, 10.1186/1471-213X-9-47.

Jandus, C., Bioley, G., Rivals, J.P., Dudler, J., Speiser, D., Romero, P., 2008. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. Arthritis Rheum., 58(8), pp. 2307-17.

Javierre, B.M., Fernandez, A.F., Richter, J., Al-Shahrour, F., Martin-Subero, J.I., Rodriguez-Ubreva, J., Berdasco, M., Fraga, M.F., O'Hanlon, T.P., Rider, L.G., Jacinto, F.V.,Lopez-Longo, F.J., Dopazo, J., Forn, M., Peinado, M.A., Carreño, L., Sawalha, A.H., Harley, J.B., Siebert, R., Esteller, M., Miller, F.W., Ballestar, E., 2010. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythemat osus. Genome Res., 20(2), pp. 170-9.

Jeffries, M.A., Dozmorov, M., Tang, Y., Merrill, J.T., Wren, J.D., Sawalha, A.H., 2011. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupuserythematosus. Epigenetics., 6(5), pp. 593-601.

Ju, J.H., Kim, H.Y., Park, S.H., 2007. Clinical images: bamboo spine in a patient with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum., 56(9), pp. 3043.

Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., Chédin, F., 2006. Reconstitution and mechanism of
the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. J. Biol. Chem., 281(36), pp. 25893-902.

Kawabata, T., Nishida, K., Takasugi, K., Ogawa, H., Sada, K., Kadota, Y., Inagaki, J., Hirohata, S., Ninomiya, Y., Makino, H., 2010. Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther., 12(4), pp. R133.

Khan, M.A, 2002. Update on spondyloarthropathies. Ann. Intern. Med., 136(12) pp. 896-907.

Kim, J.K., Samaranayake, M., Pradhan, S., 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. Cell Mol. Life Sci., 66(4), pp. 596-612.

Kim, T.Y., Bang, Y.J., Robertson, K.D., 2006. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. Epigenetics., 1(1), pp. 14-23.

Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. Cell., 128(4), pp. 693-705.

Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J., Akoulitchev, A., 2002. U1 snRNA associates with TFIIH and regulates transcriptional initiation. Nat. Struct. Biol., 9(11), pp. 800-5.

Kwon, C.S., Wagner, D., 2007. Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. Trends Genet., 23(8), pp. 403-12.

Lai, N.S., Yu, H.C., Chen, H.C., Yu, C.L., Huang, H.B., Lu, M.C., 2013. Aberrant expression of microRNAs in T cells from patients with ankylosing spondylitis contributes to the immunopathogenesis. Clin. Exp. Immunol., 173(1), pp. 47-57.

Lauc, G., Huffman, J.E., Pučić, M., Zgaga, L., Adamczyk, B., Mužinić, A., Novokmet, M., Polašek, O., Gornik, O., Krištić, J., Keser, T., Vitart, V., Scheijen, B., Uh, H.W., Molokhia, M.,Patrick, A.L., McKeigue, P., Kolčić, I., Lukić, I.K., Swann, O., van Leeuwen, F.N., Ruhaak, L.R., Houwing-Duistermaat, J.J., Slagboom, P.E., Beekman, M., de Craen, A.J., Deelder, A.M., Zeng, Q., Wang, W., Hastie, N.D., Gyllensten, U., Wilson, J.F., Wuhrer, M., Wright, A.F., Rudd, P.M., Hayward, C., Aulchenko, Y., Campbell, H., Rudan, I., 2013. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. PLoS Genet., 9(1), pp. e1003225.

Leung, Y.T., Shi, L., Maurer, K., Song, L., Zhang, Z., Petri, M., Sullivan, K.E., 2015. Interferon regulatory factor 1 and histone H4 acetylation in systemic lupus erythematosus. Epigenetics., 10(3), pp. 191-9.

Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell., 115(7), pp. 787-98.

Liu, L., Kimball, S., Liu, H., Holowatyj, A., Yang, Z.Q., 2015. Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. Oncotarget., 6(4), pp. 2466-82.

López-Larrea, C., Sujirachato, K., Mehra, N.K., Chiewsilp, P., Isarangkura, D., Kanga, U., Dominguez, O., Coto, E., Penã, M., Setién, F., 1995. HLA B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. Tissue Antigens., 45(3), pp. 169-76.

Lories, R.J., Luyten, F. P., de Vlam, K., 2009. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. Arthritis Res. Ther., 11(2), p.221.

Lories, R.J., Derese, I., Luyten, F.P., 2005. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of an kylosing enthesitis. J. Clin. Invest., 115(6), pp. 1571-9.

Lu, M.C., Yang, K.L., Huang, K.Y., Tung, C.H., Liu, S.Q., Lai, N.S., 2009. HLA haplotype A33-B58-Cw10 may modulate radiographic development of bamboo spine in Taiwanese patients with primary ankylosing spondylitis. Dis. Markers., 26(2), pp. 93-6.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature., 389(6648), pp. 251-60.

Luo, S., Liu, Y., Liang, G., Zhao, M., Wu, H., Liang, Y., Qiu, X., Tan, Y., Dai, Y., Yung, S., Chan, T.M., Lu, Q., 2015. The role of microRNA-1246 in the regulation of B cell activation and the pathogenesis of systemic lupuserythematosus. Clin. Epigenetics., 7(1), pp. 24.

Malone, C.D., Hannon, G.J., 2009. Small RNAs as guardians of the genome. Cell., 136(4), pp. 656-68.

Mao, F., Leung, W.Y., Xin, X., 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnol., 9;7:76.

Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., López-Vazquez, A., Gelaz, M.A., Armas, J.B., Kanga, U., Mehra, N.K., López-Larrea, C., 2000. HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. Hum. Immunol., 61(2), pp. 131-9.

Mathioudaki, K., Scorilas, A., Ardavanis, A., Lymberi, P., Tsiambas, E., Devetzi, M., Apostolaki, A., Talieri, M., 2011. Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. Tumour Biol., 32(3), pp. 575-82.

McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. Trends Immunol., 27(1), pp. 17-23.

Mishra, N., Reilly, C.M., Brown, D.R., Ruiz, P., Gilkeson, G.S., 2006. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. J. Clin. Invest., 111(4)5 pp. 39-52.

Murata, K., Furu, M., Yoshitomi, H., Ishikawa, M., Shibuya, H., Hashimoto, M., Imura, Y., Fujii, T., Ito, H., Mimori, T., Matsuda, S., 2013. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. PLoS One., 8(7), pp. e69118.

Nafee, T.M., Farrell, W.E., Carroll, W.D., Fryer, A.A., Ismail, K.M., 2008. Epigenetic control of fetal gene expression. BJOG., 115(2), pp. 158-68.

Navallas, M., Ares, J., Beltrán, B., Lisbona, M.P., Maymó, J., Solano, A., 2013. Sacroiliitis associated with axial spondyloarthropathy: new concepts and latest trends. Radiographics., 33(4), pp. 933-56.

Newell-Price, J., Clark, A.J., King, P., 2000. DNA methylation and silencing of gene expression. Trends Endocrinol. Metab., 11(4), pp. 142-8.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell., 99(3), pp. 247-57.

Onat, A., Ademoğlu, E., Can, G., Altay, S., Karagöz, A., Köroğlu, B., Yüksel, H., 2014. Rheumatoid factor mediates excess serum lipoprotein(a) for independent association with type 2 diabetes in men. Anadolu Kardiyol. Derg., 15(0), p. 000-000.

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.M.,McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D.M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R., Moore,K.W., 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. J. Immunol., 168(11), pp. 5699-708.

Park, K.S., Kang, S.Y., Lee, W.I., 2008. [HLA-B27 subtypes in Korean patients with ankylosing spondylitis]. Korean J. Lab. Med., 28(1), pp. 46-52.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., Chan, E.K., 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res. Ther., 10(4), pp. R101.

Prakash, D., Prabhu, S.M., Irodi, A., 2014. Seronegative spondyloarthropathy-related sacroiliitis: CT, MRI features and differentials. Indian J. Radiol. Imaging., 24(3), pp. 271-8.

Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R. 3rd, Grant, P.A., 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA and SLIK dependent acetylation. Nature, 433(7024), pp. 434-8.

Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., Frossard, N., 2009. Ser276 phosphorylation of NF-kB p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. PLoS One., 4(2), pp. e4393.

Reveille, J.D., 2006. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 20(3), pp. 601-9.

Reveille, J.D., Ball, E.J., Khan, M.A., 2001. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. Curr. Opin. Rheumatol., 13(4), pp. 265-72.

Reveille, J.D., Weisman, M.H., 2013. The epidemiology of back pain, axial spondyloarthritis and HLA-B27 in the United States. Am. J. Med. Sci., 345(6), pp. 431-6.

Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C.T., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Kirazli, Y., Van den Bosch, F., Olivieri, I., Roussou, E.,Scarpato, S., Sørensen, I.J., Valle-Oñate, R., Weber, U., Wei, J., Sieper, J., 2011. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. Ann. Rheum. Dis., 70(1), pp. 25-31.

Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Listing, J., Akkoc, N., Brandt, J., Braun, J., Chou, C.T., Collantes-Estevez, E. ., Sørensen, I.J, Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Khan, M.A., Kirazli, Y., Maksymowych, W.P., Mielants, H., Ozgocmen, S., Roussou, E., Valle-Oñate, R., Weber, U., Wei, J., Sieper, J., 2009. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. Ann. Rheum. Dis., 68(6), pp. 777-83.

Saha, A., Wittmeyer, J., Cairns, B.R., 2006. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7(6), pp. 437-47.

Sang, F., Ren, J., 2006. Capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using a new fluorescence intercalating dyeEvaGreen. J. Sep. Sci., 29(9), pp. 1275-80.

Santos-Rosa, H., Caldas, C., 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. Eur. J. Cancer., 41(16), pp. 2381-402.

Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek, N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C., Goggins, M., 2003. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcin oma. Cancer Res., 63(14), pp. 4158-66.

Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., van Endert, P.M., 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. Nat. Immunol., 6(7), pp. 689-97.

Schlosstein, L., Terasaki, P.I., Bluestone, R., Pearson, C.M., 1973. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. N. Engl. J. Med., 288(14), pp. 704-6.

Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W., 2010. Rheumatoid arthritis. Lancet., 376(9746), pp. 1094-108.

Shain, A.H., Pollack, J.R., 2013. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. PLoS One., 8(1), pp. e55119.

Sieper, J., Braun, J., Rudwaleit, M., Boonen, A., Zink, A., 2002. Ankylosing spondylitis: an overview. Ann. Rheum. Dis., 61 Suppl (3), iii8-18.

Sieper, J., Rudwaleit, M., Baraliakos, X., Brandt, J., Braun, J., Burgos-Vargas, R., Dougados, M., Hermann, K.G., Landewé, R., Maksymowych, W., van der Heijde, D., 2009. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. Ann. Rheum. Dis., 68(Suppl 2), pp. 1-44.

Sudol-Szopinska, I., Urbanik, A., 2013. Diagnostic imaging of sacroiliac joints and spine in the course of spondyloarthropaties. Pol. J. Radiol., 78, pp. 43-9.Toussirot, E., Abbas, W., Khan, K.A., Tissot, M., Jeudy, A., Baud, L., Bertolini, E., Wendling, D., Herbein, G., 2013. Imbalance between HAT and HDAC activities in the PBMCs of patients with ankylosing spondylitis or rheumatoid arthritis and influence of HDAC inhibitors on TNF alpha production. PLoS One., 8(8), e70939.

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. Appl. Clin. Genet., 7, pp. 105-15.

Underwood, M.R., Dawes, P., 1995. Inflammatory back pain in primary care. Br. J. Rheumatol., 34(11), pp. 1074-7.

van den Berg, R., van der Heijde, D.M., 2010. How should we diagnose spondyloarthritis according to the ASAS classification criteria: a guide for practicing physicians. Pol. Arch. Med. Wewn., 120(11), pp. 452-7.

van der Linden, S., Valkenburg, H., Cats, A., 1983. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a family and population study. Br. J. Rheumatol., 22(4 Suppl 2), pp. 18-9.

van der Linden, S., Valkenburg,H.A., Cats, A., 1984. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. Arthritis. Rheum., 27(4), pp. 361-8.

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 ofspondylitis patients with the general population. Arthritis Rheum., 27(3), pp. 241-9.

van Duivenvoorde, L.M., Dorris, M.L., Satumtira, N., van Tok, M.N., Redlich, K., Tak, P.P., Taurog, J.D., Baeten, D.L., 2012. Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human β2 -microglobulin-transgenic rat model of spondylarthritis. Arthritis Rheum., 64(10), pp. 3210-9.

van Echteld, I., Cieza, A., Boonen, A., Stucki, G., Zochling, J., Braun, J., van der Heijde, D., 2006. Identification of the most common problems by patients with ankylosing spondylitis using the international classification of functioning, disability and health. J. Rheumatol., 33(12), pp. 2475-83.

Wang, C., Liao, Q., Hu, Y., Zhong, D., 2015. T lymphocyte subset imbalances in patients contribute to ankylosing spondylitis. Exp. Ther, Med., 9(1), pp. 250-256.

Wang, G.G., Allis, C.D., Chi, P., 2007. Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. Trends Mol. Med., 13(9), pp. 373-80.

Wang, H., Peng, W., Ouyang, X., Li, W., Dai, Y., 2012. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. Transl. Res., 160(3), pp. 198-206.

Wang, X., Roberts, C.W., 2014. CARMA: CARM1 methylation of SWI/SNF in breast cancer. Cancer Cell., 25(1), pp. 3-4.

Wang, Z., Tang, F., Qi. G., Yuan, S., Zhang, G., Tang, B., He, S., 2015. KDM5B is overexpressed in gastric cancer and is required for gastric cancer cell proliferation and metastasis. Am. J. Cancer Res., 5(1), pp. 87-100.

Wei, Y., Yang, J., Yi, L., Wang, Y., Dong, Z., Liu, Z., Ou-yang, S., Wu, H., Zhong, Z., Yin, Z., Zhou, K., Gao, Y., Yan, B., Wang, Z., 2014. MiR-223-3p targeting SEPT6 promotes the biological behavior of prostate cancer. Sci. Rep., 4,7546.

Wellcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), 2007. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. Nat. Genet., 39(11), pp. 1329-37.

Wong, R.H., Wei, J.C., Huang, C.H., Lee, H.S., Chiou, S.Y., Lin, S.H., Cai, Y.W., Hung, P.H., Wang, M.F., Yang, S.F., 2012. Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity ofankylosing spondylitis. J. Rheumatol., 39(1), pp. 135-40.

Wright, P.B., McEntegart, A., McCarey, D., McInnes, I.B., Siebert, S., Milling, S.W., 2015. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. Rheumatology (Oxford)., doi, 10.1093.

Wu, H., Zhao, M., Chang, C., Lu, Q., 2015. The Real Culprit in Systemic Lupus Erythematosus: Abnormal Epigenetic Regulation. Int. J. Mol. Sci., 16(5), pp. 11013-11033.

Xia, Y., Liu, Y.Q., Chen, K., Wang, L.C., Ma, C.Y., Zhao, Y.R., 2015. Association of IL-1R2 genetic polymorphisms with the susceptibility of ankylosing spondylitis in Northern Chinese Han population. Mod. Rheumatol., 2, pp. 1-5.

Yan, S., Yim, L.Y., Lu, L., Lau, C.S., Chan, V.S., 2014. MicroRNA Regulation in Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis. Immune Netw., 14(3), pp. 138-48.

Zambrano-Zaragoza, J.F., Agraz-Cibrian, J.M., González-Reyes, C., Durán-Avelar Mde, J., Vibanco-Pérez, N., 2013. Ankylosing spondylitis: from cells to genes. Int. J. Inflam., 2013, 501653.

Zhao, M., Liang, G., Wu, X., Wang, S., Zhang, P., Su, Y., Yin, H., Tan, Y., Zhang, J., Lu, Q., 2012. Abnormal epigenetic modifications in peripheral blood mononuclear cells from patients with alopecia areata. Br. J. Dermatol., 166(2), pp. 226-73.

Zhou, J.J., Wang, G.S., Li, X.P., Li, X.M., Qian, L., 2013. Activation of hypomethylated DNA on plasmacytoid dendritic cells in patients with systemic lupuserythematosus. Zhonghua Yi Xue Za Zhi., 93(39), pp. 3119-21.

Zhu, X., Liang, J., Li, F., Yang, Y., Xiang, L., Xu, J., 2011. Analysis of associations between the patterns of global DNA hypomethylation and expression of DNA methyltransferase in patients with systemic lupus erythematosus. Int. J. Dermatol., 50(6), pp. 697-704.

Zhu, Z.Q., Tang, J.S., Cao, X.J., 2013. Transcriptome network analysis reveals potential candidate genes for ankylosing spondylitis. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 17(23), pp. 3178-85.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Seyma	**Soyadı**	COLAKOGLU
Doğum Yeri	Konya	**Doğum Tarihi**	01.02.1988
Uyruğu	TC	**TC Kimlik No**	61753037798
E-mail	Seymacolakoglu5@gmail.com	**Tel**	05365198860

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2015
Lisans	Halic Universitesi	2010
Lise	Bursa Ahmet Vefik Pasa Lisesi	2005

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Stajyer	Yeditepe Universitesi	2009
2.	Stajyer	Medical Park Hastanesi	2008
3.	Stajyer	İstanbul Universitesi	2007

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama**	**Konuşma**	**Yazma**
İngilizce	İyi	Orta	Orta

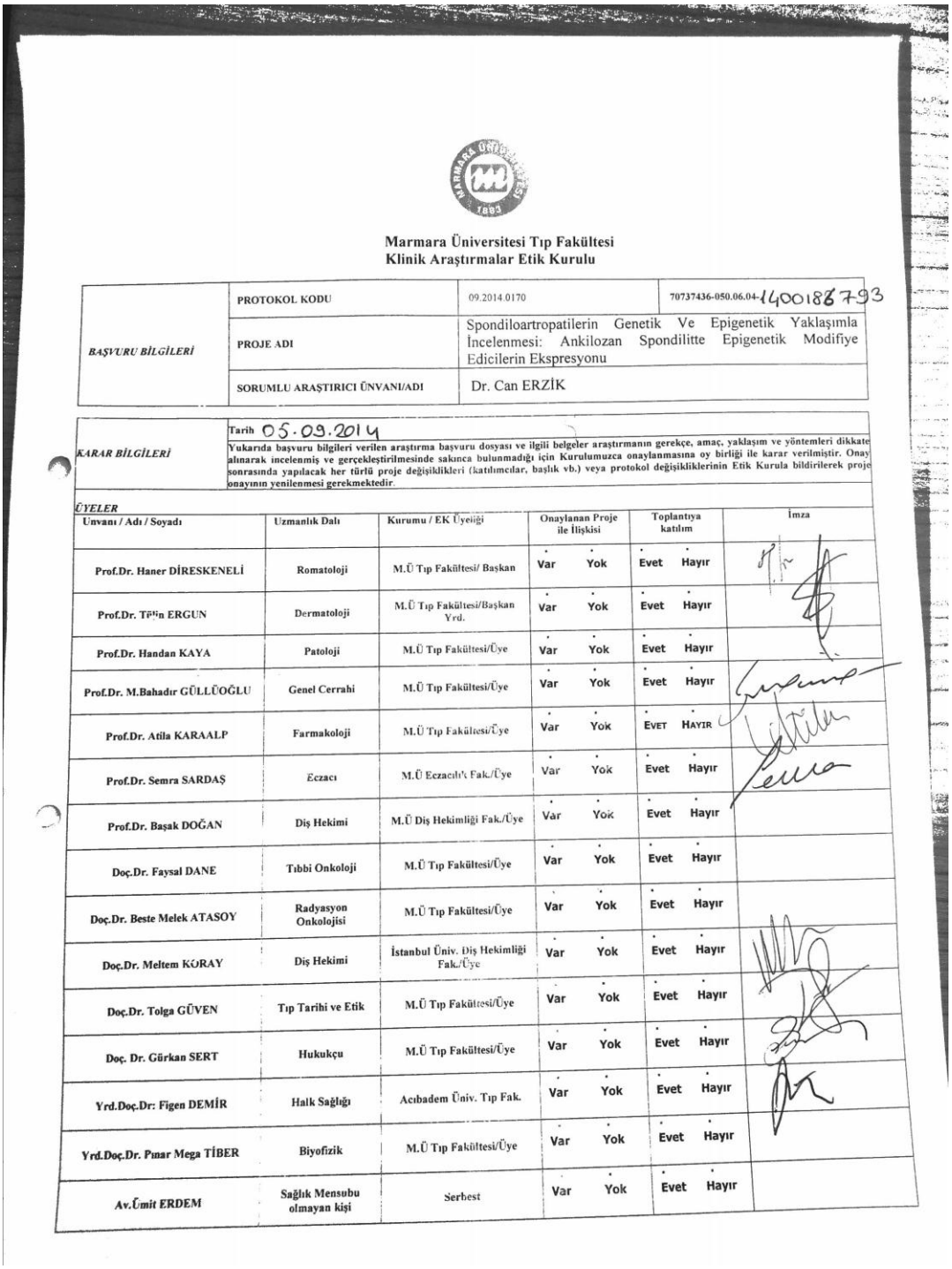
Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	80,44022	81,36184	70,89457

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Word	İyi
Excell	İyi
Powerpoint	İyi

10. ETİK KURUL ONAYI



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2014.0170	70737436-050.06.04-14001887 93
	PROJE ADI	Spondiloartropatilerin Genetik Ve Epigenetik Yaklaşımla İncelenmesi: Ankilozan Spondilitte Epigenetik Modifiye Edicilerin Ekspresyonu	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Dr. Can ERZİK	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 05.09.2014 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	EVET HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Faysal DANE	Tıbbi Onkoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	Evet Hayır	