TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPONDİLOARTROPATİLİ HASTALARDA, JAK2, STAT3, TNFRSF1A GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Saeid ASSADPOUR

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr.Türker DUMAN

2013- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPONDİLOARTROPATİLİ HASTALARDA, JAK2, STAT3, TNFRSF1A GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Saeid ASSADPOUR

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr. Türker DUMAN

2013- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Diyagnostik İmmünoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Tamamlanmış olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi Olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.09.2013

Prof. Dr. Ümit ÖLMEZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Türker DUMAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Erkan YILMAN
Ankara Üniversitesi
Bioteknoloji Enstitosu

Doç. Dr. Erdinç DEVRİM
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbı Biokimya Anabilim dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Ankilozan Spondilit	3
1.2. Epidemiyoloji	3
1.3. Etyopatogenez	4
1.3.1. İmmün Hücreler ve Sitokinlerin AS Patojenezinde Rolü	6
1.3.1.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (*TNFα*)	7
1.3.1.2. Interlökin–6 (IL-6)	7
1.3.1.3. Interferon Gama (IFN- γ)	8
1.4. Klinik Bulgular	8
1.5. Tanı	10
1.5.1. Labratovar Bulguları	10
1.5.2. Tanı Kriterleri	11
1.5.2.1. Modifiye New York Kriteri	11
1.6. Ankilozan Spondilitin Genetiği	12

1.6.1. HLA Genleri 13

1.6.1.1. *HLA-B27* ve Ankilozan Spondilit 15

1.6.1.2. SpA'de HLA-B27 Spesifik CD8 T Lenfositler (CTL) 17

1.6.1.3. ß$_2$-Mikroglobulinsiz Ağır Zincirin Mühtemel Rolü 18

1.6.1.4. HLA-B27 Proteinlerinin Yanlış Katlanmasının Rolü 18

1.6.1.5. Hayvan Modelleri 19

1.6.2. HLA Dışı Genler 19

1.6.2.1. *STAT* 3 21

1.6.2.2. *JAK* 2 23

1.6.2.3. STAT-JAK Yolağı 23

1.6.2.3.1. STAT-JAK Yolağı ve AS 25

1.6.2.4. TNF-α 25

1.6.2.4.1. TNF-α'nın Fonksiyonları 26

1.6.2.4.2. *TNFRSF1A* 27

1.6.2.4.3. TNF Ailesi ve Ankilozan Spondilit 27

1.6.2.4.4. AS'li Hastalarda TNF Seviyesi ve Anti-TNF'in Etkisi 28

2. GEREÇ VE YÖNTEM 30

2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması 30

2.2. DNA İzolasyonu 31

2.2.1. Gereklı Malzemeler 31

2.2.2. DNA'nin Elde Edilmesi 31

2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) 33

2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanması 33

2.4. RFLP (Restriksiyon Enzimi Uzunluluk Polimorfizmleri) 36

2.5. SSP Yöntem ile HLA-B27 Tayini 39

2.5.1. HLA-B27'in Belirlenmesi 40

2.6. Agaroz Jel Elektroforezi 40

2.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması 41

2.6.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi 42

2.6.2.1. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi 42

2.6.2.2. RFLP Ürünlerinin Jele Yüklenmesi 43

2.7. İstatiksel Analiz 45

3. BULGULAR 46

4. TARTIŞMA 51

5. SONUÇ VE ÖNERILER 54

ÖZET 55

SUMMARY 57

KAYNAKLAR 59

EK-ETİK KURUL KARARI 72

ÖZGEÇMİŞ 74

ÖNSÖZ

Spondiloartropatiler (SpA) ortak genetic yatkınlığa ilaveten benzer klinik ve radyolojik özellikler gösteren birbiriyle ilişkili heterojen bir grup kronik otoimmün hastalığı ifade etmektedir. SpA'nın en anlaşılmış prototipi Ankilozan spondilit'dir. Ankilozan spondilit (AS), önceki isimleri "Bechterew hastalığı; Bechterew sendromu; Marie Strümpell hastalığı", kronik, ağrılı, inflamatuar bir hastalıktır. Hastalığın, etyopatogenezi tam olarak bilinmemektedir. İkiz çalışmalarında *HLA-B27* geni başta olmak üzere, genetiğin hastalık üzerinde önemli rolü olduğu göstermiştir. Genom Çaplı Bağlantı Çalışmaları (GWAS) son yıllarda hastalıkla ilişkili birçok gen belirlenmiş ve MHC dışı genlerin'de hastalık patogenezinde rolü olduğunu öne sürülmüştür.

Biz bu çalışmada, GWAS çalışmalarında AS ile ilişkilendirilen üç gende; Signal Transducer and Transcription Activator 3 (*STAT 3*), Janus Kinase 2 (*JAK II*) ve Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (*TNFRSF1A*) vaka-kontrol genotiplendirme çalışması yaparak genlerin AS'le ilişkilerini araştırdık.

Öncelikle tez çalışmamı planlamamda ve yürütmemde hiç desteğini esirgemeyen danışman hocam Yr. Doç. Dr. Türker DUMAN'a, master eğtimim süresince bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK, Prof. Dr. Ümit ÖLMEZ hocama, çok teşekür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda bilgileri ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, Semahat AKBAY başta olmak üzere, Mine HAVAN, Rahime AKSOY, Özgün BAĞLAN, Mustafa ÖZDEMIR, laboratuvardaki diğer çalışanlara ve dostlarıma, hep yanımda olup beni bu aşamaya getiren annem, babam ve abime sonsuz teşekür ederim.

SIMGELER ve KISALTMALAR

AAÜ	Akut Anterior Üveit
CRP	C-Reaktif Protein
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DAMP	Hasar-ilişkili Moleküler Model
DNA	Deoksiribonükleik asit
DZ TWINS	Çift Yumurta İkizleri
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EPO	Eritropoetin
ER	Endoplazmik retikulum
ERAP1	Endoplazmik retikulum Amino Peptidase 1
ESR	Eritrosit Sedimantasyon Hızı
GHR	Büyüme Hormonu Reseptörü
GWAS	Genom Çaplı Bağlantı Çalışmaları
HLA	İnsan Lökosit Antijenleri
HLA-B27	İnsan Lökosit Antijenleri-B27
IBH	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

IBP	İmmünoglobülin Bağlayan Protein
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	İnterlökin
IL12	İnterlökin 12
IL23R	İnterlökin 23 Reseptörü
JAK II	Janus kinas 2
LTBR	Lenfotoksin Beta Reseptör
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MZ TWINS	Tek Yumurta İkizleri
NKG2D	Doğal öldürücü G2D reseptörü
NK	Doğal öldürücü hücre
PAMP	Patojen-ilişkili moleküler patern
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRLR	Prolaktin Reseptöru
RBC	Kırmızı Kan Hücreleri
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit

SI	Sakroiliak
SpA	Spondiloartropati
SNP	Tek Nükleotid Değişiklikleri
STAT3	Transkripsiyon Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatörü 3
TASC	Avustralya-Anglo-Amerikan Spondilit Konsorsiyumu
TCR	T Hücre reseptörü
TGF-β	Dönüşüm Büyüme Faktör-β
TH17	T Helper 17
THPO	Trombopoetin
TLR	Toll benzeri reseptör
TNFRSF1A	Tümor Nekroz Faktör Reseptörü Süperaile-1A
WTCCC	Wellcome Trust Vaka Kontrol Konsorsiyumu

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. AS'deki ilk semptom ve ilk tanı (Feldtkeller ve ark., 2000) 4

Şekil 1. 2. HLA sınf I'ın yapısı 13

Şekil 1. 3. HLA sınıf II'nın yapısı 14

Şekil 1. 4. 6'ıncı kromozom üzerinde HLA bölgesi 14

Şekil 1. 5. HLA-B27'nin farklı yapıları ve AS'e sebep olabilecek hipotezler 17

Şekil 1. 6. *STAT*3 geninin genomik konumu (GeneCards-STAT3, 2013). 22

Şekil 1. 7. *JAK* II geninin genomik konumu (GeneCards- Janus kinase 2, 2013 23

Şekil 1. 8. JAK-STAT yolunun aktivasyonu 24

Şekil 1. 9. *TNFα* 'nın genomik konumu (GennCards-TNFα, 2013) 26

Şekil 1. 10. *TNFRSF1A* 'nın genomik konumu (GensCards-TNFRSF1A, 2013) 27

Şekil 2. 1. *STAT*3 geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi 35

Şekil 2. 2. *JAK* II geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi 35

Şekil 2. 3. *TNFRSF1A* geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi 36

Şekil 2. 4. *STAT* 3 geni, HPAII enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; soldan 1 marker, 2 pcr ürünü, 3,5,9,10, 12 CC (homozigot), 6,7, 8, 11 CT (heterozigot), 4 TT (uncut) 43

Şekil 2. 5. *JAK* II geni Mbo I enzimi ile kesimi sonrası *JAK* II geni Mbo I enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; 1 marker, 2 pcr ürünü, 3 GG (uncut), 4,6,7,11,12, CC (homozigot), 5,8,9,10 CG (hetrozigot) 44

Şekil 2. 6. *TNFRSF1A* geni R92Q polimorfizminin BSTN I enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; 1 marker, 2 pcr ürünü, 3,4,5,6,7,8, R/R, 9 R/Q 45

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.1984 Modifiye New York kriterleri (Van der Linden, 2005) 12

Çizelge 1.2. HLA serotipleri ile otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki (Janeway Immunobiology, 1999) 15

Çizelge 1.3. Farklı popülasyonlarındaki *HLA-B27* alt tipleri sıklıkları (Akkoc ve Khan 2005) 16

Çizelge 1.4. AS kalıtımında etkisi teyit olmuş genler (Reveille, 2012) 20

Çizelge 2.1. Kullandığımız restriksiyon enzimleri ve optimom sıcaklık değerleri 37

Çizelge 2.2. Kullandığımız enzimlerin tanıdığı bölgeler 37

Çizelge 3.1. Ankilozan Spondilitli hastaların yaş /cinsiyet ve görülen semptom yüzdeleri 46

Çizelge 3.2. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı grubu genotip oranlarının karşılaştırılması 47

Çizelge 3.3. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı grubu genotip oranlarının Karşılaştırılması 48

Çizelge 3.4. Ankilozan Spondilit hastalarında, *STAT*3 alleleri ile *HLA-B27* pozitiflik oranı 48

Çizelge 3.5. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı gurubu genotip oranlarının Karşılaştırılması 49

Çizelge 3.6. AS hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda, *JAK* II geninde cinsiyete göre genotip oranlarının karşılaştırılması 49

Çizelge 3.7. AS hastaları ve sağlıklı kontrol gurubunda, *STAT* 3 geninde cinsiyete göre genotip oranlarının karşılaştırılması 50

Çizelge 3.8. AS hastalar ve sağlıklı kıntrol gurubunda, *TNFRSF1A* geninde cinsiyete göre genotip oranlarının karşılaştırılması 50

1. GİRİŞ

Spondiloartropatiler ya da yeni terimiyle spondiloartritler (SpA), ortak genetic yatkınlığa ilaveten benzer klinik ve radyolojik özellikler gösteren birbiriyle ilişkili heterojen bir grup kronik otoimmün hastalığı ifade etmektedir (Van der Linden, 2008). SpA kavramı içinde yer alan hastalıklar prototipi ankilozan spondilit (AS) olmak üzere, psöriyatik spondiloartrit, reaktif spondiloartrir, inflamatuvar barsak hastalıkları ile ilişkili spondiloartrit ve farklılaşmamış (andiferansiye) spondiloartritlerdir (BRAUN, ve SIEPER. 2007).

Ankikozan Spondilit (AS), Romatoid Artrit'den sonra, en sık görünen ikinci romatizmal hastalıktır. Özellikle omurga ve sakroiliak eklemlerini etkileyen, etyolojisi kesin belli olmayan, sistemik, kronik ve inflamatuar bir hastalıktır. En yaygın spondiloartropati hastalığı olan AS, dünya nüfusunun %0.1–%1.4 ini etkiler ve erkek kadın oranı 2-3:1 ve ortalama hastalık başlangıç yaşı 26'dır (7 ile 40 yaş arası >90% hastalarda), (Kenna ve ark., 2011). En yaygın erken semptomlar bel ve kalçada ağrı ve uyku ile kötüleşip hareket ile iyileşen sertleşmedir. Çocuklarda asimetrik oligoartrit ve entezis (ligamentlerde iltihab), ergenlerde ise Sakroileit görünmektedir. Şiddetli olgularda omur eklemlerinde omurga boyunca kemikleşme (ankiloz) olur. Periferik artrit ve akut anterior üveit (AAÜ) hastaların ~%40'ında, inflamatuar barsak hastalığı ve psoriasis hastaların ~%10'unda oluşur (Arasıl, 2000; Dakwar ve ark., 2008).

Ankikozan spondilit'in nedeni tam olarak bilinmemektedir, ama ikizler üstünde yapılan araştırmalar MHC genlerinin özelikle *HLA-B27* geni başta olmak üzere, genetiğin hastalık üzerinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. HLA-27'inin nasıl hastalığa yol açtığı konusunda farklı hipotezler mevcuttur. Bu hipotezler içinde, yanlış protein sunma hipotezi daha kabul gören bir hipotezdir. Genom çaplı bağlantı çalışmaları (GWAS) araştırmalarında çok sayıda AS'li hasta ve sağlıklı kontroler

DNA'ları çalışılmış ve tek nükleotid değişiklikleri (SNP) belirlenmiştir. İki grup arasında kıyaslamalarda 1p, 2q, 5q, 6p, 9q, 10q, 16q ve 19q lokusları ile AS arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu lokuslarda, yer alan genlerden *ERAP1, İL23R, İL12, STAT3, JAKII, TNFRS1A*' nın, bir çok otoimmün hastalıkla ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Ankilozan spondilit'in semptomları kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte en sık rastlanan bulgular, sakroiliak eklem ve aksiyel iskelette inflamasyon nedeniyle oluşan bel ağrısı, tutukluluk, periferal artrit ve entezitdir. Başka semptomlar, yorgunlık ve halsizlik, hafif ateş, kilo kaybı, osteoporozdur. Bazı hastalarda AS ile birlikte üveit, inflamatuar barsak hastalığı, ve başka spondiloartropatiler görülür.

Serum değerleri incelendiğinde, Sedimantasyon (ESR) ve CRP'de artış, IgA düzeylerinde hafif yükselme, Trombosit sayısında artış, hafif normokrom normositer anemi görülebilir. *HLA-B27*'in pozitif olması önemlidir ama laboratuvar bulguları, klinik belirtileri olmadan hastalığa tanı koymak için yeterli değildir (Kabasakal, 2003).

1961 yılından beri AS tanısı için farklı kriterler oluşturulmuş ve yeterli olmadığı düşünülerek zaman içinde değişiklikler yapılmıştır, örneğin 1966 yılında yapılan New York kriteri, 1984 yılında değişmiş ve Modifiye New York kriteri ismini almıştır. Halen bu kriter kulanılmaya devam edilmektedir (Van der Linden ve ark., 2005).

Biz çalışmamızda Modifiye New York kriteri ile tanı alan hastalarda, PCR-RFLP yöntemini kullanarak *STAT*3, *JAK* II ve *TNFRSF1A* genlerindeki rs8074524, rs10974944 ve rs4149584, polimorfizimlerin hastalıkta ilişkili olup olmadığının belirlenmesini amaçladık. Bu pozisyonlardaki polimorfizmlerin, AS'le bağlantılı olup olmadığı konusunda, GWAS çalışmaları dışında herhangi bir çalışma yoktur. Ülkemizde ilk kez gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın, hastalığın etyolojisinde bu genlerin önemini açıklayarak, literatür bilgilerine katkı sağlayabileceğini umut ediyoruz.

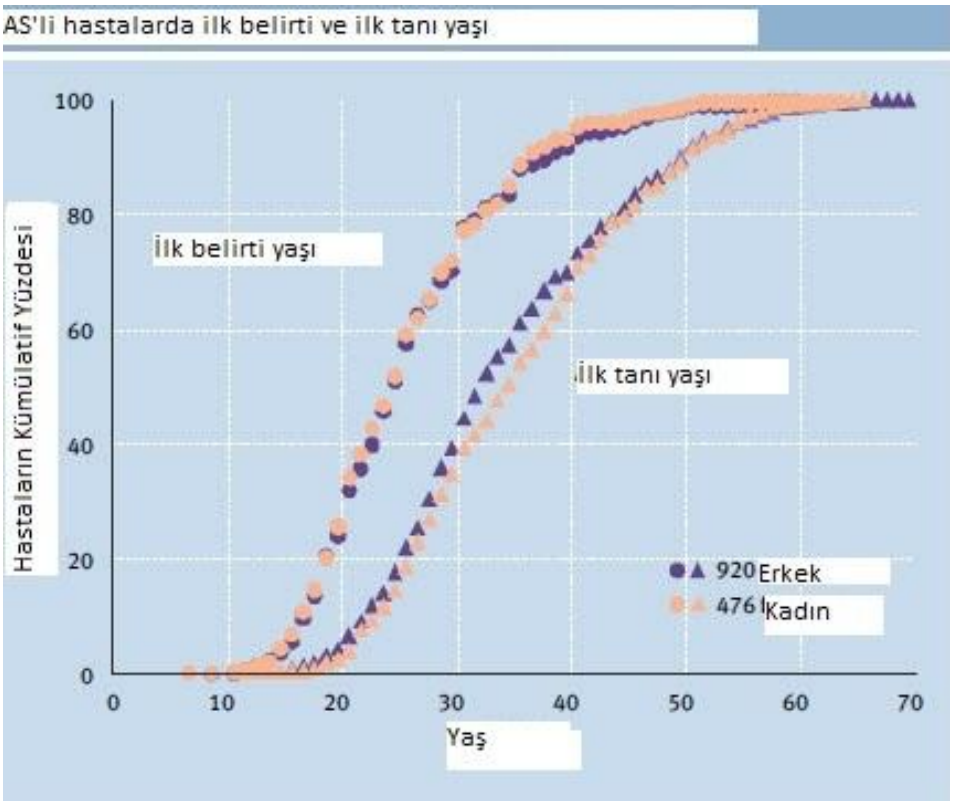
1.1. Ankilozan Spondilit

Ankilozan spondilit (AS) eklemlerde, özelikle bel ve kalçada iltihaba sebep olan, otoimmün bir hastalıktır ve romatoid artrit'den sonra, en sık görünen ikinci romatizmal hastalıktır (Gran ve Husby, 1995). AS yaş, cinsiyet ve hastanın ırkına bağlı olarak, çok farklı şekillerde ortaya çıkabilir, buna rağmen teşhis ve tedavide aynı yöntemler kullanılmaktadır. AS, kalıtsal bir hastalıktır ve hastaların %90'ı *HLA-B27* geni ile doğarlar (Taurog ve Lipsky, 1998). *HLA-B27* pozitif olan bireylerin, AS olma riski yüksek iken, hastalığın tayininde tek başına kullanılmamalıdır. Bu genin pozitif olduğu bireylerde AS olma riski, olmama riskinden 6 kat (%12) daha fazladır (Karaaslan ve Doğanavşargil, 1996).

1.2. Epidemiyoloji

Ankilozan spondilit bütün dünyada görülmekle birlikte prevalansı, etnik guruplara göre değişiklik göstermektedir. Hastalık dünya nüfusunun %0.1–%1.4 ini (Kenna ve ark., 2011). Popülasyondaki *HLA-B27*'nin dağılımı ile, *HLA-B27*'ye bağlı hastalıkların dağılımı, birbirine paralel gitmektedir. Bu nedenle AS beyaz ırkta daha sık görülür (Kabasakal, 1999). Beyaz ırkta AS'li hastalarının %90'nında *HLA-B27* pozitifiken, sağlıklı populasiyonun %2'sinde *HLA-B27* pozitif dir (Ball, 1993), bu oran *HLA-B27* pozitif AS'li hastaların birinci derece akrabalarında hastalık var ise %10-30 kadar görülmektedir (Lipsky ve El-Gabalawy, 2003). Diğer taraftan *HLA-B27*' nin görülmediği Afrikalı siyahlarda ve Japonlarda (100,000' de 9, 5) AS prevalansı düşüktür (Çalgüneri , 2004).

AS, gençleri genelikle 26 yaş civarında etkileyen bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık %80'inde ilk semptom 30 yaşdan önce, %5'den azında ise 45 yaşdan sonra gelişir. Hastaların %20'den fazlasının ilk semptomu 20 yaşdan önce başlar (Feldtkeller ve ark., 2000), (Şekil 1.1). Hastalık erkekleri 2-3:1 oranı ile kadınlardan daha sık etkiler (Feldtkeller ark., 2003; Barr ve Keat, 2010).



Şekil 1. 1. AS'deki ilk semptom ve ilk tanı (Feldtkeller ve ark., 2000).

1.3. Etyopatogenez

Hastalığın etyolojisi belli olmamasına rağmen çevresel ve genetik bileşenler yatkınlık yapan faktörler olarak görünür. İkizler üstünde yapılan araştırmalar genetiğin Ankilozan Spondilit'de %97 rolü olduğunu göstermektedir (Brown ve ark., 1997). Toplumdaki *HLA-B27* pozitifliğinin yaygınlığı, B27 ilişkili hastalıkların oluşmasında önemli bir etkendir. Eğer toplumda *HLA-B27*'nin prevalansı düşükse, AS görülme oranında ve sıklığında önemli bir azalma görülür (Kabasakal, 1999; Lipsky ve El-Gabalawy, 1998). *HLA-B27* önemli genetik risk faktörüdür ve *HLA-B27* ile AS arasındaki güçlü genetik ilişki diğer hastalıklar arasında yoktur (Kenna ve ark., 2011). B27 transgenik sıçan modelleri ile yapılan çalışmalarda AS'de çevresel faktorlerin rolü olduğu gösterilmiştir; B27 si pozitif germ free fareler [1] hasta olmazken, normal bakterilere maruz kalan B27

[1] -germ free fareler: Steril ortamda doğup, büyüyen fareler

transgenik farelerde hastalık gelişiyor (Taurog ve ark., 1994). *HLA-B27* ilişkili reaktif artritler ve enterik ürogenital infeksiyonlar arasındaki ilişki iyi tanımlanmış olmasına rağmen AS'de mikroorganizmaların etkisi çok açık değildir. AS'de reaktif artritin aksine hastalıktan sorumlu olabilecek belirli bir mikroorganizma saptanamamıştır. Sadece, barsak florasında sıklıkla kolonize olabilen ve HLA-B27 ile ortak 6 amino asit dizisi olan Klebsiella Pneumonia birkaç klinik ve deneysel çalışma sonucuna göre suçlanmış, ancak bu konuda kesin sonuca ulaşılamamıştır (Lipsky ve El-Gabalawy., 2003). Spondiloartropatiler içinde, enfeksiyon sonrası geliştiği bilinen hastalık, reaktif artrit iken; AS için, böyle bir başlangıç oldukça nadirdir. AS'de özel bir bakteriyel tetikleyicinin etkin olup olmadığı kesin değildir. Serumda yüksek anti-klebsiella antikorları, bağırsakta lezyonlar saptanabilir ve gayta kültüründe, klebsiella üretilebilir. Hastalığı tetikleyen bir mikroorganizmanın varlığını düşündüren diğer bir bulgu AS'li hastaların sakroiliak eklem biyopsilerinde makrofajlar, T hücreleri, yüksek düzeylerde tümör nekrozis faktör-α (TNF-α) ve transforming growth faktör-β (TGF-β) bulunmasitır (Doğanavşargil, 1996; Ringrose, 1999).

Ankilozan spondilit'de etkilenen yapılar özellikle apofizer ve sakroiliak eklemlerin sinovyası, intervertebral diskler, eklem kapsülleri, ligamentöz yapıların yanısıra simfizis pubis ve manubriosternal eklemler olmak üzere kartilajinöz yapılardır. Omurlar, iliak kanatlar, patella, trokanterler, kalkaneus gibi ligamanların kemiğe tutunma noktaları da (entesis) sıklıkla tutulur (Van der linden ve ark, 2005). Ligamentöz yapılardan ve entesis noktalarından başlayan inflamasyonu (entesitis), kemik dokusu oluşumu ile iyileşme izler. Fibröz dokudaki bu kemikleşme kıkırdak oluşmadan gerçekleşir. Entezis noktalarındaki kemik erozyonları da aynı kemikleşme süreci ile iyileşir (Van der linden ve ark., 2005). Spinal ligamanların herhangi bir bölgesinde ve annulus fibrozusta da benzer patolojik bulgular izlenir. Eroziv lezyonlarda lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonu mikroskopik olarak gösterilmiştir. Annulus fibrozus ve onu çevreleyen ligamanların kemikleşmesi ile sindesmofitler oluşur. Kemikten kıkırdak dokuya geçişin olduğu diskle omur cismi arasındaki "end-plate"de ise kronik inflamatuvar hücrelerin yer aldığı granülasyon dokusu ve yeni kemik dokusunun

oluştuğu görülür. Sindesmofitler omur cisimleri arasındaki diski geçen yeni kemik köprüleridir ve hastalığın geç dönemlerinde disk aralığında görülen AS'ye özgü bir bulgudur. Daha ileri evrelerde disk aralığı tümüyle kemik doku ile dolabilir. Kalça, omuz gibi etkilenen diartrodial eklemlerde de kemik köprüler oluşabilir (Khan, 2003; Vernon-Roberts, 2003). Sakroiliit AS'nin erken dönemlerinde görülür ve ilk patolojik değişimler iliak taraftadır. AS'nin erken dönemine ait patolojik veriler pek fazla yoktur, ancak ilerleyen dönemlerde eklem aralığında genişleme, eklem yüzlerinde erozyon, subkondral skleroz, terminal dönemde de enkondral kemikleşme ve kemik köprüler izlenir. İleri dönemlerde inflamasyon bulgusu yoktur. Apofizer eklemlerde olduğu gibi eklem aralığında füzyon olmaksızın kapsüler kemikleşme görülebilir. Normal kişilerde de 40 yaşından sonra sakroiliak eklem ankilozu olabilir. 60 yaşındaki erkeklerin %80'inde, kadınların %30'unda kısmi veya tam ankiloz görülebilir. Ancak yaşla ilişkili ankiloz, sakroiliak eklemin ligamentöz (üst) bölümünde görülürken sinovyal bölümün ankilozu sadece AS'de görülür (Vernon-Roberts, 2003; Brower ve Sanolen, 2003).

1.3.1. İmmün Hücreler ve Sitokinlerin AS Patojenezinde Rolü

Bir genetik defekt, bağışıklık sisteminin patojen silme yeteneğini azaltabilir ve düşük seviyede subklinik enfeksiyona sebep olur, ki o patojenin self antijen veya self antijenlere benzeyen bir antijen sunmasıyla otoimmün cevaba yol açabilir. İmmün hücreleri, çeşitli mikrobiyal peptitleri algılayan, birçok molekül eksprese eder. Bunlar toll-like reseptörleri (TLR), Dectin-1, PAMP'lar ve DAMP'lar içerir. İmmün hücrelerin, mikrobiyal ürünlerin tanınmasında bozukluk, IL-23, IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuar sitokinler, inflamatuar kaskada neden olabilir. AS patogenezini doğal ve adaptif immünitenin nasıl etkilediği bilinmemektedir. Çeşitli immün hücrelerin, hastalığın farklı evrelerinde ve hastalığın farklı bölgelerde kesin rolünü anlamak, yeni tedavi hedefleri geliştirmek için önemlidir.Yeni araştırmalara göre AS hastalarının periferik kanındaki γδ T hücrelerinin %25'den fazlası IL-23R'u ve yüksek miktarda IL-17 eksprese ederler ve Th17'ye karşı güçlü eğilim gösterirler. Bu veriler γδ T hücrelerinin, AS patojenezinde önemli rolü olduğunu gösterir. γδ T hücreleri doğal-adaptif sistemler arasında köprü

olan, IL-23R ve IL-1 yanısıra, Dectin-1, Toll-like receptorları ve NKG2D gibi sayısız aktivasyon reseptörlerini eksprese ettiği göz önüne alındığında, bu hücreler AS patogenezinde daha fazla araştırma için çekici birer aday hücredir (Kenna ve ark., 2012).

1.3.1.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (*TNFα*)

Tümör nekrozis faktör alfa'nın Ankilozan Spondilit etiyopatogenezindeki rolü üzerinde yoğun olarak araştırmalar sürmektedir. Aşırı *TNFα* ekspresyonu ile karakterize bir transgenik fare modelinde insandaki hastalığa çok benzeyen bir spondilit gelişmektedir **(**Maksymowych, 2003). Sakroiliyak eklemlerden alınan sinoviyal biyopsilerde makrofajlar, CD4+ ve CD8+ T hücreler, *TNFα* mRNA' sı gösterilmiştir **(**Braun ve ark., 1995). Hem AS' li olgular, hem de B27 pozitif sağlıklı yakınlarında *TNFα* pozitif T hücre sayıları B27 negatif kontrollere göre azalmıştır. Ankilozan spondilitli olgularda hem periferik kan, hemde kolon lamina propriasında Th1 sitokin [interlökin (IL)-2 ve interferon gamma (IFNγ)] ekspresyonunda bozulma olduğu **(**Rudwaleit ve Höhler, 2001) bunun yüksek *TNFα* konsantrasyonlarının T hücreleri tarafından IL-2 ve IFNγ üretimini bozmasından kaynaklandığı, barsaklarda T hücrelerinin bakterilere karşı savunmasının bozulması sonucu kronik inflamasyon ve otoimmunite ortaya çıktığı düşünülmektedir **(**Maksymowych, 2003).

1.3.1.2. Interlökin–6 (IL-6)

Interlökin-6 çoğunlukla mononükleer fagositler tarafından salgılanır ve Th hücreler tarafından aktive edilir. Temel fonksiyonu B hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını ve immünglobülinlerin üretimini sürdürmektir. IL-6'nin AS immünopatogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (Bal ve ark., 2007).

1.3.1.3. Interferon Gama (IFN- γ)

Interferon gamma doğuştan ve adaptif immün cevapta anahtar immün regülatuvar proteindir. Tip II interferon olarak da bilinir. Konak tarafından ekspresyonu birçok seviyede kontrol edilen tek kopya bir gendir. IFN-γ `nın biyolojik etkisi çok yaygındır. Neredeyse her hücre tipi bu proteinle etkileşime girdiğinde değişikliğe uğrar. IFN-γ `nın regülasyonu ve etkileri komplekstir ve konak yaşamı için gerekli olan multipotent bir sitokin olduğu düşünülmektedir. IFN-γ primer olarak CD4+T lenfositler tarafından salgılanırken, NK, CD8+T hücreler ve az miktarda B lenfositler tarafından da salgılanabilmektedir. Lenfositler ve NK hücreleri üzerine etkili olmakla beraber temelde bir makrofaj aktive edici faktördür (Young ve Bream, 2007).

1.4. Klinik Bulgular

Ankilozan spondilitin temel klinik özellikleri; sakroiliak eklem ve aksiyel iskelette inflamasyon nedeniyle oluşan bel ağrısı, periferal artrit, entezit ve anterior üveittir. Hastaların yaklaşık %75`de ilk belirti bel ağrısı ve tutukluğudur. Bu yakınmanın özelliği, yavaş yavaş başlayıp giderek artması, en az üç ay boyunca devam etmesi, tutukluğun sabah veya istirahat sonrası daha fazla olması ve yakınmaların egzersizle ve hareketle azalmasıdır. Sabah tutukluğu üç saate kadar sürebilir ve hastaların çoğu bel ağrısı ve tutukluğunu ayırt edemeyebilirler Yapısal değişiklikler, kemik yıkımından ziyade yeni kemik oluşumu nedeniyle ortaya çıkar (Arasıl, 2000; Dakwar ve ark., 2008).

Kostovertebral eklemler dahil olmak üzere torakal omurga tutulumu nedeniyle öksürükle artan, bazen plöritik tarzda sırt ve göğüs ağrısı olabilir (Vanderlinden, 2005; Şenel ve Erdal, 2002) Hastalarda şiddetli inflamasyonun sonucunda, omurga tamamen kaynaşarak ankiloze olur (Lories ve ark., 2009). Ankiloz sonucu bambu omurga denilen görüntü ortaya çıkar. Omurgada kaynama, göğus kafesi sertleşmesine neden olur, böylece akciğer kapasitesi ve fonksiyonu azalır (Brionez ve Reveille, 2008).

Hastlalık nedeniyle yüksek seviyede olan inflamasyon moleküleri kemik mineral yoğunluğu azalmasına neden olur ve Osteoporoza yol açabilir (Kenna ve ark., 2011).

Erken bulguarın biri entezittir, Tendonların kemiğe yapışma bölgesinin inflamasyonu olan entezit, kostosternal bileşkeler, spinöz çıkıntılar, iliak kanatlar, büyük torakanterler, tüber iskiadikumlar, tibial tüberküller ve topuklar gibi eklem dışı kemik yapılarda hassasiyete yol açar. Topuk ağrısı sık rastlanan bir şikayettir (Brower ve Sanolen, 2003).

Akut anterior üveit (AAÜ) en sık görülen eklem dışı tutulum şeklidir (yaklaşık %30), (Rudwaleit ve ark., 2009). Gözde ağrı, fotofobi, sulanma, hafif bulanık görme bulguları verir (Ritchlin, 2006). AS hastaların endoskopik incelemeleri ile yaklaşık %60 hastada intestinal inflamasyon saptanmıştır. Bazı hastalarda semptomatik hale gelebilir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar AS hastaları genel nufusla karşılaştırıldığında birçok kardiyovasküler hastalıklar için yüksek risk altında olduğu bildirilmektedir (Szabo ve ark., 2011). Aort dilatasyonu, aort kapak yetmezliği, iletim defektleri, myokardiyal disfonksiyon ve perikardit olabilir. Yeni bir araştırmada yaş, cinsiyet ve yerellik olarak 700 AS'li hasta kontrol grubuyla karşılaştırılmış, dolaşım sistemi hastalık nedeniyle ölüm oranı AS'li hastalarda daha yüksek oranda olduğuna saptanmıştır (Bakland ve ark., 2011).

Nefrotik sendrom düzeyinde proteinüri ile karakterize ve böbrek yetmezliğine neden oaln sekonder amiloidoz, spondiloartropatili hastaların %1-3`de görülür. Ayrıca artmış IgA düzeyleri ve proteinürinin eşlik ettiği IgA nefropatisi, yavaş etkili antiromatizmal ilaç ve steroid olmayan antiinflamatuar ilaç kullanımına bağlı nefropati görülebilir (Szabo ve ark., 2011). Diğer bulgular kronik yorgunluk, ağrılar ve tutukluk nedeni ile uyku bozukluğu, hafif iştahsızlık, kilo kaybı ve subfebril ateş gibi özellikle hastalığın başlangıç döneminde görülebilir (Brionez ve Reveille, 2008).

1.5. Tanı

1.5.1. Labratovar Bulguları

Hastaların %75'inde eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve diğer akut faz reaktanları artmıştır ancak ESH her zaman hastalık aktivasyonu ile ilişkili değildir. C-reaktif protein (CRP), hastalık aktivitesini daha iyi gösteren bir akut faz yanıtıdır (Kabasakal, 2003). Genellikle, ESH ve CRP yüksekliği, AS'nin aksiyel tutuluşundan çok, periferal tutuluşu ile ilgilidir (Kabasakal, 1999). Serum IgA düzeyleri hafif-orta derecede artmış bulunur ve genellikle akut faz reaktanları ile korelasyon gösterir. AS'li hastalarda serum IgA'nın yüksek düzeylere ulaştığına dair birçok çalışma mevcuttur (Arasıl, 2000).

Kompleman düzeyleri normal veya artmıştır. Romatoid faktör ve diğer antinükleer antikorların pozitiflikleri sağlıklı populasyondan farklı değildir. Trombosit sayısında hafif artış, hafif normokrom normositer anemi görülebilir. Bazı hastalarda alkalen fosfataz ve kreatin kinaz düzeylerinde hafif yükselme olabilir ancak önemi bilinmemektedir (Arnett, 1997). Periferik eklem tutulumunda sinovyal sıvı analizinde elde edilen bulgular diğer inflamatuvar artropatilerden farklılık göstermez. Renal tutulum söz konusu değilse böbrek fonksiyon testleri ve idrar tetkiki normaldir (Feldtkeller ve ark, 2000). HLA-B27 antijeni hastaların %90'ı veya daha fazlasında pozitiftir. Akut anterior üveit veya spondilitik kalp hastalığı olduğunda bu oran artabilir (Arnett, 1997; Khan, 1999).

Öykü ve fizik muayenenin AS'i düşündürdüğü, ancak radyolojik bulguların tanıyı desteklemediği durumlarda ön tanıda yardımcı olabilir. Sağlıklı beyaz popülasyonda *HLA-B27*'nin %8 oranında pozitif olduğu ve bu kişilerin yaklaşık %90'ında hiçbir zaman bu hastalığın gelişmeyeceği düşünülürse HLA-B27 testinin tanısal amaçla kullanılmasının gereksizliği anlaşılabilir (Khan, 2002). Solunum fonksiyon testlerinde solunum yetersizliği bulguları saptanmaz. Göğüs kafesinin

hareketliliğinin azalmasına bağlı olarak vital kapasite ve total akciğer kapasitesinde azalma, rezidüel akciğer kapasitesi ve fonksiyonel rezidüel kapasitede artış görülür, ancak hava akımı ölçümleri ve diffüzyon testleri normaldir (Fisher ve ark., 1990).

1.5.2. Tanı Kriterleri

Ankilozan spondilitin tanısı klinik özelliklere dayalıdır. Hastalık, başka bir ilişkili hastalık yoksa "birincil" veya "idiyopatik", psöriyazis veya kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili ise ikincildir. Günlük uygulamada, AS klinik tanı şüphesi genellikle sakroileitin radyolojik kanıtı ile desteklenir. Çoğu hekim AS'i "semptomatik sakroileit" olarak düşünür, Ancak sakroileit varlığı her zaman AS olduğu anlamına gelmez. Bunun ötesinde, AS'de radyografik sakroileit çok sık olsa da, hiçbir biçimde hastalığın erken veya zorunlu bir bulgusu değildir. Daha önceki tanı kriterlerin sınıflamaları duyarlılık ve özgüllüğünün yetersiz olması (1961 Roma, 1966 New York kriterleri) AS için New York Ölçütleri'nde bazı değişikliklerin yapılmasına yol açmıştır (Modifiye NEW York kriteri) (Van der Linden ve ark., 1984). "Lomber omurgada hareket kısıtlılığı" ve "göğüs ekspansiyonunda kısıtlanma" gibi ölçütleri hastalık süresini yansıtır gibi gözükmektedir; hastalığın erken döneminde genellikle saptanmazlar. Sınıflama ölçütlerinin hastalığın erken tanısı için çok uygun olmadığı vurgulanmaktadır (Van der Linden ve ark., 2005).

1.5.2.1. Modifiye New York Kriteri

Günümüzde yaygın şekilde kulanılan modifiye New York kriteri, tanı için radiografilerde görülen sakroilite dayanarak yapılır (Van der Linden ve ark., 2005), (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1.1984 Modifiye New York kriterleri (Van der Linden ve ark., 2005).

1. 3 aydan uzun süren, egzersiz ile rahatlayan, istirahat ile düzelmeyen bel ağrısı
2. Lomber omurga hareketinin frontal ve sagital düzelmede kısıtlanması
3. Yaşa ve cinsiyete gore göğüs ekspansiypnunun azalması
4. Bilateral Evre 2-4 sakroilitis
5. Tek taraflı Evre 3-4 sakroilitis
Kesin Ankilozan Spondilit: 4.5. Madde+1 klinik kriter

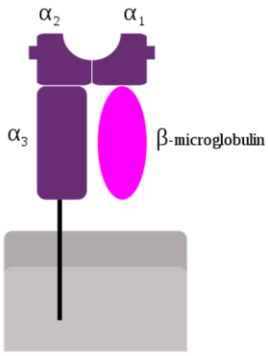
1.6. Ankilozan Spondilitin Genetiği

Patogenezinde genetik etmenlerin en fazla rol oynadığı romatizmal hastalık olan Ankilozan Spondilit ile ilgili olarak çok sayıda HLA ve HLA dışı gen araştırılmıştır. Etiyopatogenezde en önemli rolü kuşkusuz *HLA-B27* oynamaktadır (Maksymowych, 2003). İkiz kardeşlerde yapılan incelemeler ve geniş genom taramaları (Genome-wide association study) AS'de genetik etkilerin rolünün anlaşılmasında başlıca iki yaklaşımdır (Brown ve ark., 1997).

AS' li ikizlerde yapılmış çalısmalar hastalık riskine ciddi anlamda genetik katkının olduğunu göstermektedir. AS'in toplam konkordansı monozigotik ikizlerde (MZ) %63, dizigotik ikizlerde (DZ) ise %23 bulunmuştur, Bu sonuçlara göre hastalık riskinin %90'ının genetik yatkınlıkla ilgili oldugu tahmin edilmektedir. Birinci derece akrabasında AS olan *HLA-B27* (+) bireylerde hastalığın gelişme riski akrabalarında AS olmayan *HLA-B27* (+) kişilere göre 6 ile 16 kat kadar artmaktadır (Braun ve Sieper., 2007).

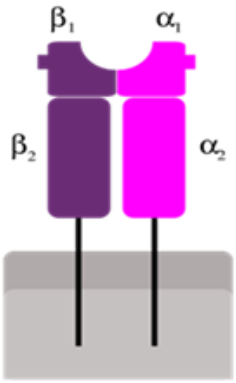
1.6.1. HLA Genleri

Büyük doku uyumu antijenleri (MHC), insan da HLA (Human Leukosyte Antigen) olarak adlandırılır. İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan MHC bölgesi insandaki karşılığı, 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş. Çok sayıda genin yeraldığı yaklaşık 4000 kilobaz (kb) büyüklüğündeki bu bölgede immun yanıtla ilgisi tanımlanamamış bazı genler de yer alır. MHC, kodlanan proteinlerin özelliklerine göre Sınıf I, II, III olarak alt bölgelere ayrılır. Sınıf I bölgesi, MHC nin telomerik ucunda yer alır. HLA-A, B, C olarak da tanınan klasik transplantasyon antijenlerini ve HLA–E, F, G gibi klasik olmayan Sınıf I antijenleri kodlayan gen lokuslarını, HLA-H, J, K, L, X gibi psödogenleri ve gen segmentlerini içerir. Sınıf I molekülleri nükleuslu tüm hücrelerde ve trombositlerde eksprese olur. Bunlar üç alfa polipeptidi ve beta-2 mikroglobulinden oluşmaktadır.



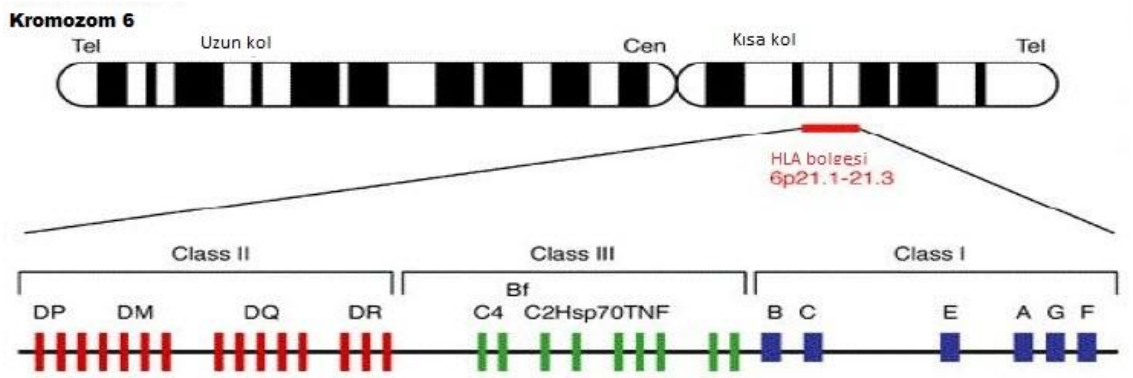
Şekil 1. 2. HLA sınf I'ın yapısı

Sınıf II bölesi ise sentromere yakın yerleşmiş olup; HLA -DRA, -DRB, -DQA, -DQB,-DPA, -DPB, -DNA, -DMA, -DOB gibi antijen işlenmesinde rol olan lokusların yanı sıra çeşitli psödogenleri, LMP1, LMP2, TAP1, TAP2 gibi içerir. MHC klas II, B lenfosit, aktive T lenfosit, makrofaj, dendritik hücre ve langerhans hücrelerinde ifade edilir.



Şekil 1. 3. HLA sınıf II'nın yapısı

HLA DRB ile HLA B bölgeleri arasında kompleman komponentleri (C2, C4 ve faktör B), sitokinler (interferon, TNF-α,β), enzimler (21 hidroksilaz koenzim) ve bazı ısı sok proteinleri gibi HLA dışı proteinleri kodlayan Sınıf III genleri bulunur (Şekil1.4).



Şekil 1. 4. 6'ıncı kromozom üzerinde HLA bölgesi

MHC moleküllerinin yabancı antijenleri vücuda ait olandan (self) ayırt etmelerinden dolayı immün tanımada önemlidirler. Hücre yüzeyinde bulunan MHC molekülleri yabancı antijenleri bağlar ve immün sistemin effektör hücrelerine sunarak immün cevabın başlamasına neden olurlar.

HLA genlerinin birçok otoimmün hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bu genlerden *HLA-B27* Ankilozan spondilit, Postgonokokal Artrit, Akut Anterior Üveit de, *HLA-DR2* Sistemik lupus Eritematozus (SLE)'de , *HLA-DR3* Sijögren sendromu,

Otoimün Hepatit, tip 1 Diabet melitus ve SLE'de, *HLA-DR4* RA ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Mitchell ve ark., 2007). Bazi HLA serotiplerinin otoimmün hastalıklarla ilişkisi aşağıda gösterilmiştir (Janeway Immunobiology, 1999), (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. HLA serotipleri ile otoimmün hastalıklar arasında ilişki (Janeway Immunobiology, 1999).

Hastalık	HLA Aleli	İlgili risk	Cinsiyet oranı
Ankilosan Spondilit	B27	87.4	0.3
Akut Anterior Üveit	B27	10.04	<0.5
Goodpasture sendromu	DR2	15.9	~1
Multipl skleroz	DR2	4.8	10
Basedow hastalığı	DR3	3.7	4-5
Myastenia gravis	DR3	2.5	~1
SLE	DR3	5.8	10-20
Tip 1 diabet Mellitus	DR3/DR4 Hetrozigot	~25	~1
Romatoid Artrit	DR4	4.2	3
Pemfigus Vulgaris	DR4	14.4	~1
Hashimoto tiroiditi	DR5	3.2	4-5

1.6.1.1. *HLA-B27* ve Ankilozan Spondilit

İlk kez 1973 yılında *HLA-B27*'inin Ankilozan Spondilit'de yatkınlık yaptığı gösterilmiştir (Brewerton ve ark., 1973). *HLA-B27* AS'ile bağlantısı en güçlü gen olarak bildirilmiştir (Brown, 2011). Normal populasyonda *HLA-B27* sıklığı %5, AS hastalarda %95 olması hastalıkta çok büyük katkısı olduğunu gösterir (Colbertve ark, 2009). *HLA-B27* ile AS arasında güçlü bağ olmasına rağmen, patojenezi henuz tam olarak belli değildir (Gabriel ve Michaud, 2009). *HLA-B27*'nin 60 yakın aleli vardır (Keidel ve ark, 2013) ve en yaygını HLA-B*2705 olmakla birlikte bunların çoğunun hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır (Akkoc ve Khan, 2005), (Çizelge 1.3).

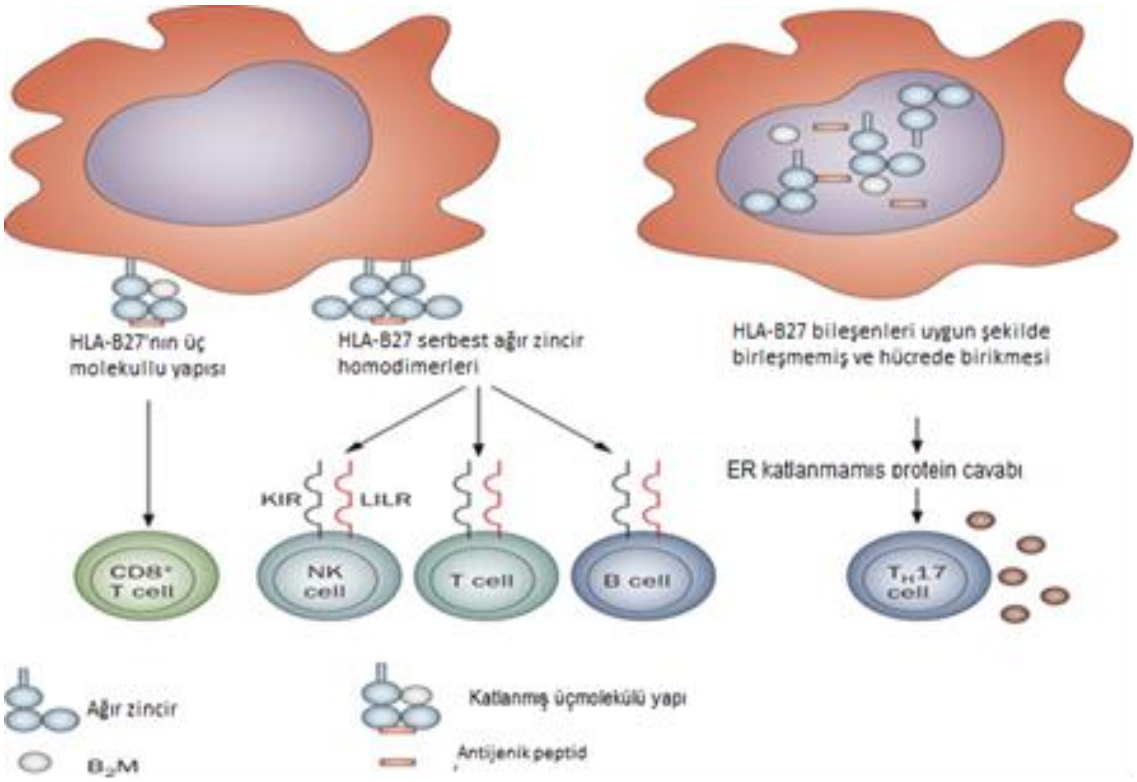
Çizelge 1.3. Farklı popülasyonlarındaki *HLA-B27* alt tipleri sıklıkları (Akkoc ve Khan 2005).

Popülasyon	***HLA-B27* alt tipleri**										
	27:01	27:02	27:03	27:04	27:05	27:06	27:07	27:08	27:09	27:13	27:14
Kuzey Avrupa		10			90						
Danmarka		10			90						
Güney Avrupa		20			80						
İspaniya		18			80			3			
Kuzey İspaniya		7			91		1			1	
Azores			7		86		7				
İtaliya		30			65		2		3		
Sardinya		3			77				20		
Yunanıstan		34	8		50		8				
Kıbrıs		52			32		17				
Türkiye	7	30			43		14	5			
Lübnan		24	12		35		30				
İsrail		48		3	38		13				
Sibirya		14			84						2
Kuzey indistan				33	61		6				
Batı Hindistan				34	34		18	12			2
Japonya				82	18						
Çin		2		66	31		2				
Tayvan	0.05	0.5		87	4	7	2	0,02			
Tayvan (Han)			3	94	6						
Tayvan aborjinleri				100							
Çin Endonezyalılar				38		62					
Yerli				6		89					
Endonezyalılar					6	72		3			
Malezya				49	6	53					
Tayland				42	5						
Maoris				36	64						
Brezilya		10	6		80			3			
Doğu Afrika		50			50						
Batı Afrika			32		68						

Alt tipler arasında sadece 1-2 amino asit de fark vardır (Sheehan, 2004; Paladini ve ark., 2005). Örneğin, Sağlıklı bireylerde görünen, ve hastalıkla bağı olmayan B*2709 ve B*2706 alelleriyle (D'Amato M.1995; Paladini ve ark., 2005) AS'li hastalarda en yaygın görünen HLA-B*2705 arasında sadece 116. pozisyondaki amino asit farklıdır.

HLA-B*2709 ve HLA-B*2706 116' ıncı pozisyonda Tirozin ve Histidin içerirken, B2705 alt tipinde burada Aspartat yer almaktadır (Maksymowych, 2003; Galocha ve De Castro, 2010).

HLA-B27'nin AS patogenezinde rolünü açıklayan farklı hipotezler öne sürülmüştür (Tam ve ark, 2010), bu hipotezlerden en çok araştırılmış olanları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5. HLA-B27'nin farklı yapıları ve AS'e sebep olabilecek hipotezler

1.6.1.2. SpA'de HLA-B27 Spesifik CD8 T Lenfositler (CTL)

Yapılan çalışmalarda HLA-B27'ye spesifik olan CD8+ T lenfositler gösterilmiştir. Aynı TCR varlığı farklı SpA'li hastalarında gösterilmiştir (May ve ark., 2002). Bu da farklı hastaların aynı antijene yanıt verdigini düşündürmektedir. Artrojenik peptit hipotezine göre, artirite sebep olan ve HLA-B27 spesifik olan ve otoantijenler ile çapraz reaksiyon veren bir antijenik peptid vardır. Bu yüzden *HLA-B27* (+) birey artrite sebep olan bir

patojen ile enfekte olduğunda eklemde HLA-B27 spesifik CTL aracılı otoimmün cevap başlatılabilir. Yersinya gibi bakteriyel peptitler dışında olayı başlattığından şüphelenilen bir diğer antijen de kartilaj kökenli tip II kollajen ve proteoglikanlardır (McGonagle ve ark., 1998; Poole 1998).

1.6.1.3. ß$_2$-Mikroglobulinsiz Ağır Zincirin Mühtemel Rolü

HLA-B27 klasik yapısının yanı sıra, ß2-Mikroglobulin parçası olmadan da peptidleri sunabilir. Bunun da artrite zemin hazırlayabildiği gösterilmiştir (Khare ve ark., 1998). Klasik dörtlü yapısı olmadan da, HLA-B27 molekülünün artriti başlatabilmesi CD8 T lenfositlere antijen sunma mekanizmasından başka mekanizmalarında rol aldığını düşündürmektedir.

1.6.1.4. HLA-B27 Proteinlerinin Yanlış Katlanmasının Rolü

HLA-B27 ağır zincir yanlış katlanması ve endoplazmik retikulumun (ER) yanlış katlanmış proteinlerle dolması SpA hastalıklarla ilişkili görünmüştür. (Colbert, 2000; Colbert ve ark., 2009). HLA-B27 hücre yüzeyine çıkmadan önca, ER da ağır zinciri sentezlenir ve daha sonra, ß2-Mikroglobulin ve diğer bileşenleri bağlanıp, hazırlanır. Bütün komponentler eklenince molekül olgun hale gelerek hücre yüzeyine taşınır.

HLA-B27 diğer HLA alellerinden çok yavaş katlanması açısından farklıdır. Genelde katlanmamış moleküller ER içinde kalır ve birikirler. Biriken peptidlere İmmünoglobülin bağlayan protein (İBP) bağlanarak hücrenin stresine sebep olur (Eren ve ark., 2010).

Katlanmamış proteinler biriktiğinde ‘katlanmamış protein cevabı’ denilen bir sinyal iletişimi başlar. Bu genelde NFkB aktivasyonuna ve IL23R fazla üretimine sebep olur. IL23R üretiminin artmasıda, IL-17 üreten T Helper hücrelerin aktivasyonu yol açar

ve artrite sebep olur (Colbert ve ark., 2010). Bu genelde NFkB aktivasyonuna sebep olur ve artrite sebep olan proinflamatuar sitokinlerin salınımına neden olur. Bu katlanmamış protein yanıtı, *HLA-B27* transgenik farelerden elde edilen makrofajlarda gösterilmiştir. SpA hastalarında sinovyal sıvı mononükleer hücrelerinde katlanmamış protein cevabının birçok kanıtı mevcüttur (Gu ve ark., 2002).

1.6.1.5. Hayvan Modelleri

HLA-B27 ile ilişkili olarak uygulanan hayvan modellerinde insan HLA-B27'si ve β2-mikroglobulin geni verilen fare'lerde periferal ve vertebral eklemlerde inflamasyon ve insan Reaktif Artrit'ine benzer klinik bulgular geliştiği gösterilmiştir (Khare ve ark., 1996 ; Zhang ve ark., 2002). Bu çalışmalar *HLA-B27* tek başına hayvan modellerinde spondiloartropati gelişmesi için yeterli olmadığı gösterilmiştir. Çalışmada 2 tür fare kullanılmış, birincisi steril ortamda büyütülen fareler ve diğeri normal ortamda yaşayan fareler. Bu transgenik farelerin, steril ortamlarda büyütüldügünde artrit geliştirmemeleri, ancak normal ortamlarda büyütüldüklerinde artrit gelişebilmesi, olayın başlaması için bir patojen gerekli oldugunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2002)..

1.6.2. HLA Dışı Genler

Son yıllarda MHC dışı genlerle AS arasında bağ olduğu başlıca iki anahtar araştırma ile rapor edilmiş. İlk araştırmada 14 500 non-synonymous SNP, Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) and Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) tarafından gözetlenmiş ve *ERAP1* ve *IL23R* hastalıkla ilişkili görünmüştur (WTCCC TASC, 2007). İkinci araştırma TASC tarafından, komple genom boyu izlenmiş ve 2p15, 21q22 ve IL1R2 ve ANTXR2 hastalıkla ilişkilı olduğu kaydedilmiştir (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium, 2009). Bu genler AS hastalığının toplam kalıtımının %25- %39'una katkıda bulunur, geri kalan büyük kısmı ise HLA-B27'ye aittir (Brown, 2011) (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. AS kalıtımında etkisi tayit olmuş genler (Reveille, 2012).

Genin adı veya kalıtımında Kromozomal bölge	En çok ilişkili SNP	Odd ratio	AS Genel katkı %
HLA-B27	rs4349859	90.4	23.3
IL23R	rs11209026	1.90	0.31
LTBR-*TNFRSF1A*	rs11616188	1.38	0.075
2p15	rs10865331	1.36	0.54
ERAP1	rs30187	1.35	0.34
KIF21B	rs2297909	1.25	0.25
21q22	rs378108	1.25	0.035
TBKBP1	rs8070436	1.24	0.054
ANTXR2	rs4389526	1.21	0.054
PTGER4	rs10440635	1.20	0.052
RUNX3	rs11249215	1.19	0.12
IL12B	rs65556416	1.18	0.11
CARD9	rs10781500	1.18	0.034
IL1R2	rs2310173	1.18	0.12
Total	-	-	25.39

Sonraki araştırmalar Genom Çaplı Bağlantı Çalışmalarından yola çıkarak şüpheli genleri PCR-RFLP ve DNA dizi analizi ile düzenledikleri hasta ve konrol grupleri arasında kıyaslamış ve anlamlı olup olmadığı irdelenmiştir.

ERAP1: Endoplasmic Reticulum aminopeptidase 1, Oksitokinas ailesinnendır ve ana fonksiyonu MHC sınıf 1e sunulacak peptidleri optimal uzunluğa yanı 9 amino asit uzunluğuna ayarlamaktır (Yan ve ark., 2006). Bu bulgular, anormal antijen sunulmasının AS patojenezinde önemli olduğunu düşündürmektedir. Özelikle *HLA-B27* ile *ERAP 1* etkileşimi, AS'li hastalarda meydana gelmektedir (*ERAP 1* alellerinin *HLA-B27* ye özgün peptidler sunması), (Evans ve ark. 2011), bunun benzeri sedef hastalığında HLA-Cw*06:02 ve ERAP1 arasında tanımlanmıştır (Lysell ve ark., 2012). Bu iki gen arasındakı etkileşim, HLA-B27 nin tek başına patojenik olmadığını ve yanlış sunum sonucu hastalığa neden olabileceğini göstermektedir. ERAP 1 de fonksiyon kaybı ya değişikliğine sebep olan polimorfizmler, HLA-B27 de ağır zincir dimerizasyon veya hatalı katlanmasına neden olabilir (Reveille, 2012).

IL23R: *IL23R*'nün inflamatoar bağırsak hastalığı (İBH) (Duerr ve ark 2006), Psoriasis (Cargill ve ark 2007) ve AS patojenezinde etkisi olduğu gösterilmiştir (BURTON ve

ark., 2007). *IL23R* ve AS bağlantısı Portekiz, İspanyol (Rueda ve ark 2008), Kanada (Rahman ve ark 2008) ve İngiltere'de yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Karaderi ve ark., 2009). Doğu Asyalılarda iki çalışmada AS'lı hastalarda bu gen incelenmiş ve Han Çinliler ve Koreliler de *IL23R*'un AS ile bir ilişkisisi saptanmıştır (Davidson ve ark., 2009; Sung ve ark., 2009). *IL23R* de farklı SNP ler hastalığa sebep olabilir. Bu SNP'lerden bazıları amino asit değişikliğine neden olabilir, örneğin bu SNP'lerden birisinde 381 pozisiyonundaki arginin yerine glutamin yerleşmiştir. Bu değişikler bir kişide hastalığa nasıl risk artışı getirdiği belli değil, ama bu değişikliklerin inflamasyon üzeindeki etkisinin hastalıkla ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür (Genetics Home Reference-IL23R, 2013).

RUNX3: 2011 yılında GWAS 1p36 kromozomunda bulunan RUNX3'u AS hastalığından sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Evans ve ark., 2011). Bu geni kodlayan transkripsiyon faktörü CD8+ hücrelerin farklaşmasına neden olabilir, bu durumun HLA-B27 üzerinde etkili olabileceğini öne sürülmüştür (Park ve ark., 2010). Ayrıca AS ile ilişkili olduğu bildiriken, RUNX3 de bir SNP'in, CD8+ T hücrelerinde sayısında azalma ile birlikteliği rapor edilmiştir (Evans ve ark., 2011).

CARD9: 9q34 kromozomun üstündeki CARD9 daki bir SNP GWAS tarafından hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Evans ve ark, 2011; Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille ve ark, 2010), bu durum ingilterede 730 hastada yapılan bir araştırma ile desteklenmiştir (Pointon ve ark, 2010).

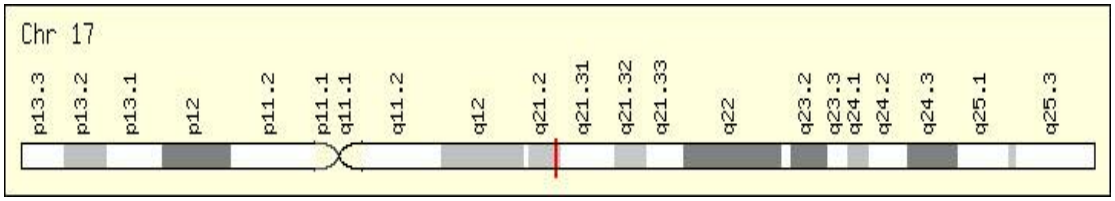
1.6.2.1. *STAT* 3

17'inci Kromozomun uzun kolunun, 21'inci lokusta yer alan bu gen, signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT* 3) proteinini kodlar. Bu protein 770 amino asitlik bir protein olup *STAT* ailesinin bir üyesidir ve hücre sitoplazmasında inaktif formda bulunur. Hücresel büyümeyi, farklılaşmayı, inflamasyon, immun yanıt ve apoptozisi düzenlerler. İlk olarak yaklaşık 10 yıl önce interferon reseptörlerinin sinyal iletiminde

önemli bir rol oynadıkları saptanmıştır (Yuan ve ark, 2004). Sonrasında STAT yolağının büyüme hormonu, eritropoetin, epidermal büyüme faktörleri gibi pek çok sitokin ve büyüme faktörü ile ilişkili oldukları ve bu sitokinlerin sinyal iletimlerinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Sitokinler ve büyüme faktorlerine tepki olarak, *STAT* aile üyeleri, kinazlar tarafından fosforile olurlar, hetero veya homodimer formları, hücre çekirdeğine yerleşip, transkripsiyonu başlatırlar. Bugüne kadar saptanmış toplam 7 tane STAT proteini vardır: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b ve STAT-6 (Bowman ve ark., 2000).

STAT3 proteinin aktivasyonunda, epidermal growth factor-receptor (EGF-R), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Colony stimulating factor (G-CSF), serotonin 5-HT2, Hepatocyte growth factor (HGF), interferonlar (IFN), interlökin 5 ve 6 (IL) gibi pek çok tirozin kinazlar ve diğer sinyal iletim sistemlerinde rol oynarlar. Küçük GTPaz Rac1 bu proteine bağlanır ve aktivitesini düzenler. Protein inhibitor of activated STAT 3 (PIAS3), *STAT* için inhibitördür.

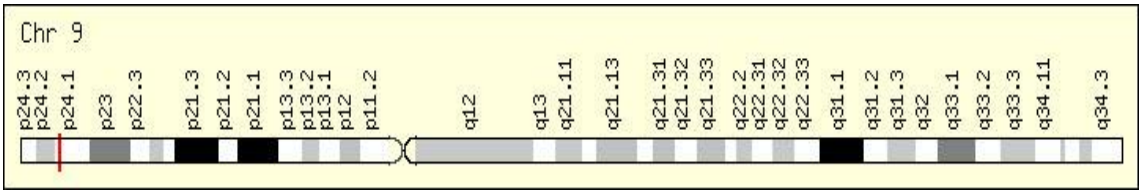
İnterlökin 6-ailesi sitokinlerinin (IL-6, onkostatin M ve lösemi inhibitör faktör dahil) Gp130 reseptörüne bağlanması *JAK*2 tarafından STAT3 fosforilasyona neden olur. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve c-Met gibi tirosin kinaz reseptörleri, ligandlarına yanıt olarak, STAT3'u fosforile ederler (Yuan ve ark, 2004).



Şekil 1. 6. *STAT*3 geninin genomik konumu (GeneCards-STAT3, 2013).

1.6.2.2. *JAK* 2

Janus Kinaz 2, 9'uncu kromozomun kısa kolunda yer alan, bir reseptörsüz tirozin kinaz ve Janus kinaz ailesinin bir üyesidir (Şekil 1.7). 143150 çift baz dan oluşan bu genin 2953 SNP'I mevcuttur. JAK 2 proteini 1132 amino asitden oluşur ve moleküler ağırlığı 130674 dalton dur (European Bioinformatics Institute -Tyrosine-protein kinase JAK2, 2013). Bu proteinin sitokin reseptör sinyal yolaklarında önemli rolü vardır. JAK 2 yapısal olarak prolaktin reseptörü ile ilişkili bulunmuştur ve gamma interferon yanıtları için gereklidir. Sitoplazmada, büyüme hormonu (GHR), prolaktin reseptöru (Prlr), leptin (leptin reseptör), eritropoetin (EPOR), trombopoetin (THPO 'dur) gibi tip I reseptörler, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma ve bir çok interlökin dahil olmak üzere tip II reseptörlerinin sinyal iletiminde önemli rolü vardır (GeneCards- Janus kinase 2, 2013).



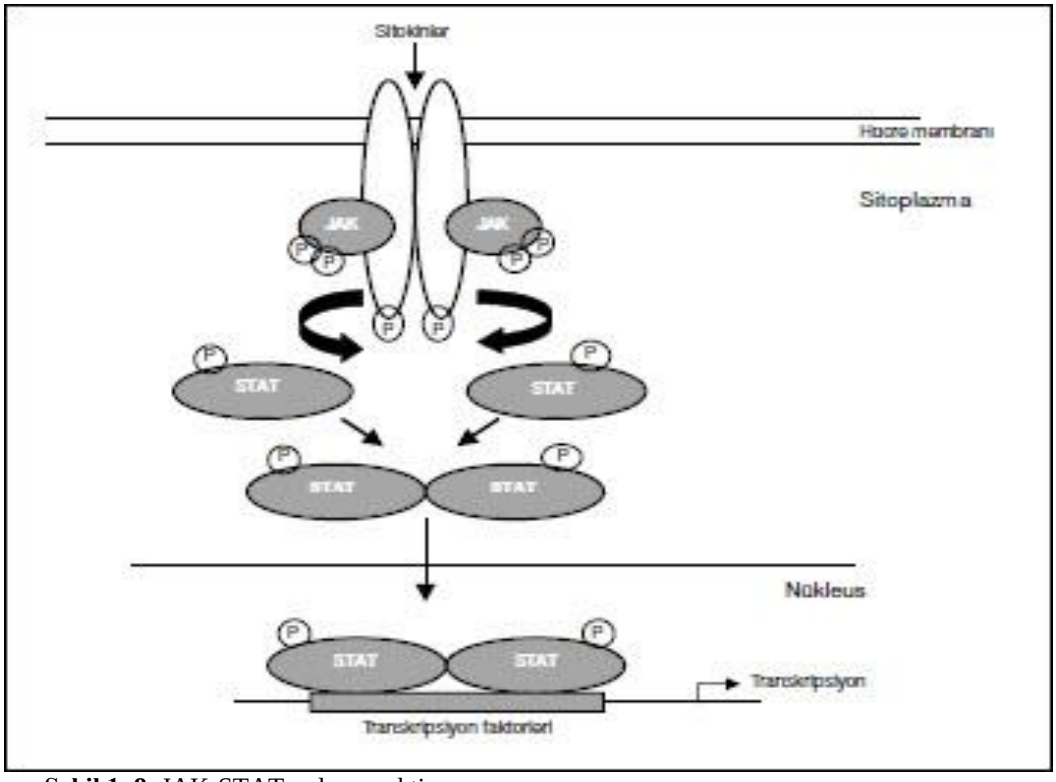
Şekil 1. 7. *JAK* II geninin genomik konumu (GeneCards- Janus kinase 2, 2013).

1.6.2.3. STAT-JAK Yolağı

STAT proteinleri 1990'lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlandı Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır:

Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır (α alt birim). Daha sonra αα ya da αβ oligomerizasyonu gerçekleşir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder. Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile ederler. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar. STAT proteinlerin daha sonra homodimer ya da

heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar(Bowman ve ark., 2000), (Şekil 1.8).



Şekil 1. 8. JAK-STAT yolunun aktivasyonu.

STAT proteinlerinin yapısında yer alan bölgelerin işlevleri şunlardır (Benekli, 2003):

1. Oligomerizasyon bölgesi: Diğer proteinler ile etkileşir, STAT tetrameri oluşumunu sağlar.
2. DNA bağlanma bölgesi: DNA'ya özgün bağlanmadan sorumludur; ligand uyarısına özgül sinyal oluşumunu sağlar.
3. SH2 bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STAT STAT etkileşimlerinden sorumlu bölgedir.
4. C-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğü ve kontrolünden sorumludur.
5. Tirozin aminoasiti: N-ucundan yaklaşık 700 aminoasit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu, bütün STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerini düzenler.

1.6.2.3.1. STAT-JAK Yolağı ve AS

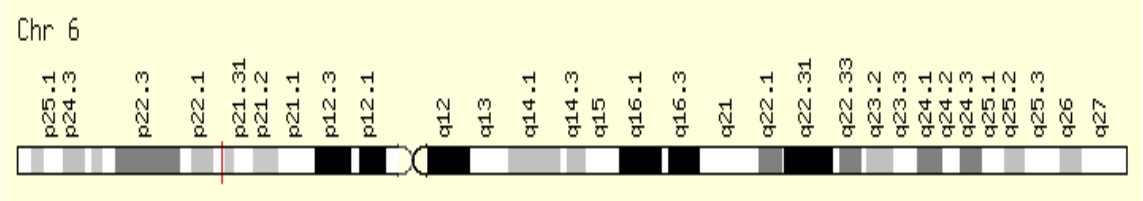
Janus kinase 2 (*JAK*2) ve signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT*3) polimorfizmi bir çok otoimmün hastalık için risk oluşturduğu gösterilmiştir (Hu ve ark, 2012). JAK2 ve STAT3'ün, immün cevapta önemli rolu olan TH1 ve TH17 hücrelerin farklaşmasında rolü olduğu bildirilmiştir (Mathur ve ark., 2007). Th17 hücrelerinin AS'li hastaların kanında yüksek seviyede olması, bu hücrelerin AS'ın patojenezinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (Jandus ve ark., 2008). *JAK2* veya *STAT3* genlerindeki mutasyon TH17 hücrelerin fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu ve AS patojenezi ile bağlantısı olabileceği ileri sürülmüştür (Yang, 2007; Milner ve ark., 2008).

*STAT*3 Crohn hastalığı (Barrett, 2008) ve Ülseratif Kolit ile (Frank eve ark., 2008) ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Araştırmalarda *JAK*2'de rs10758669 (Barrett, 2008) ve *STAT*3'de rs744166 (Barrett, 2008; Frank 2008), rs12948909, rs2293152 (Davidson SI, 2011; Sato ve ark., 2009) polimorfizmleri inflamatuar barsak hastalığı ile ilişkisi gösterilmiştir. AS hastalarının %68inde barsak iltihabı görülmektedir (Mielants ve ark., 1995). Bu hastalıkların kliniği AS'te bağlıdır. Bu bilgilerden yola çıkarak *STAT*3 ve *JAK*2 AS ile bağlantısı olduğu düşünülmüştür. Çinde yapılan araştırmada, AS ile bu genler arasında ilişki olduğunu gösterilmiştir (Kenna ve ark., 2011).

1.6.2.4. TNF-α

Altıncı kromozomun kısa kolunda yer alan bu gen 2769 baz çiftinden oluşmuş, moleküler ağırlığı 25644 dalton olan peptid yapılı TNF-α'yı kodlar (Şekil 1.9)(European Bioinformatics Institute-Tumor Necrosis Factor, 2013). Bu protein birçok hücre tipi, ağırlıklı olarak makrofajlar ve T hücreler tarafından salgılanan ve tümör hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir. 233 amino asit uzunluğundadır, ancak bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir. TNF'in geniş inflamatuar ve immünomodülatör etkileri konak savunmasında çok önemlidir (Vassalli, 1992).

TNF, TNF reseptörüne (TNFRs) bağlanarak fonksiyonlarını başlatır. TNFR ailesinin pekçok üyesi vardır. İlk olarak TNFR1ve TNFR2 keşfedilmiş ve en çok çalışma yapılmış olan iki TNF reseptörüdür. TNFR2 yüksek afinitiye sahiptir. TNFRs Sinyalleri T hücre proliferasyonunu ve proinflamatuvar yanıtlarını etkileyebilir (Tartaglia ve ark., 1991).



Şekil 1. 9. *TNFα* 'nın genomik konumu (GennCards-TNFα, 2013).

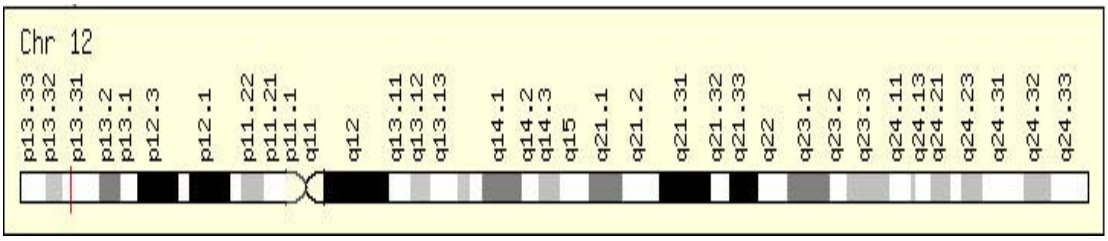
1.6.2.4.1. TNF-α'nın Fonksiyonları

Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF-α), bir inflamatuar pleiotropi sitokindir. TNF-α pek çok organları etkileyen, çeşitli fonksiyonları vardır. TNF-α büyüme üzerinde hem tetikleyici ve hem önleyici rolu vardır, ayrıca öz düzenleyici bir sitokindir. Örneğin iltihap sırasında nötrofilerin çoğalmasını teşvik eder, ayrıca nötrofilin TNF-R55 reseptörüne bağlanmasını sebep olup apoptoza uğratır (Murray ve ark., 1997). TNF-α'nın bazı fonksiyonları ;

- Mikroplar, viruslar ve mantarlara karşi immün yanıtta önemli rolu vardır. Sitokin salgılanmasını tetikler, vasküler geçirgenliği artırırlar, Ayrıca nötrofil ve monositler için kemotaktiktir ve notrofil aktivitesini de arttırır. (Janeway ve ark., 1999)
- Akut faz yanıtını uyarır ve kanda CRP artmasına neden olur.
- Hipotalamusu etkileyerek, iştahı baskılar.
- Bazi tümör hücrelerin nekrozuna sebep olurken, bazi tümör hücrelerininde büyümesini tetikler. TNFin yüksek seviyesi, mortalite riskinin artmasından sorumlu olabileceği bildirilmiştir. (Rink & Kirchner, 1996)

1.6.2.4.2. *TNFRSF1A*

Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (*TNFRSF1A*); 13357 çift baz uzunluğunda ve 12'inci kromozomun kısa kolunda yer almaktadır (Şekil 1.10). Bu gen 455 amino asit uzunluğunda ve 50495 dalton ağırlığındaki *TNFRSF1A* proteinin kodlar (European Bioinformatics Institute- TNFRSF1A, 2013). Bu protein TNF reseptör süperailesi üyesi ve TNF-α reseptörlerinden birisidir. Bu reseptör NF-kappaB'yi aktive eder, apoptoza sebep olur, inflamasyonda düzenleyici rolü vardır (GensCards-TNFRSF1A, 2013).



Şekil 1. 10. *TNFRSF1A* 'nın genomik konumu (GensCards-TNFRSF1A, 2013).

1.6.2.4.3. TNF Ailesi ve Ankilozan Spondilit

MHC'de yerleşmiş TNF-α geni AS ile ilişkili olduğu düşünülen genlerden birisidir. Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerde TNF-α seviyesi artmış olarak bulunmuştur (Rudwaleit ve ark., 2001). WTCCC2-TASC çalışmaları 12p13 kromozom bölgesinde, LTBR (lymphotoxin beta receptor) ve *TNFRSF1A* arasındaki SNP AS ile ilişkili olduğu (WTCCC2-TASC consortium, 2010), ancak AS ile bağlantılı görünen bu polimorfizmin LTBR yada TNFRSF1 den kaynaklandığının tayin etmek için başka çalışmalara gerek olduğu bildirilmiştir (Matthew 2011).

Bir çok Avrupa populasyonunda yapılan çalışmalar TNF-α promotör 308 polimorfizimi ile AS arasındakı ilişki gösterilmiştir (Höhler ve ark., 1998; Milicic ve

ark, 2000), Ama İngiltere gibi bazi ülkelerde yapılan araştırmalar sonucu, hasta ve sağlıklı guruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Milicic A ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada 306 İngiliz ve 96 Alman AS'lı hastalarda TNF deki 238 ve 308 polimirfizmlerle AS'de rolu olup olmadığını araştırmışlar, Alman hastalarda anlamlı bulunmuş, İngilteredeki hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır (Milicic ve ark, 2000). Bu durum TNF'nin tek başına hastalığa sebep olmadığı ve hastalıkla bağlantılı diğer faktörlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Rudwaleit ve ark., 2001; Lee ve Song, 2009). Buna ek olarak, başka araştırmalarda (Romero-Sánchez ve ark, 2012) TNFα seviyesinin hastalığın başlangıcında etkisi olmadığını ve sadece hastalığın klinik indeksinde artış etkisi olduğunu ileri sürülmüştür.

1.6.2.4.4. AS'li Hastalarda TNF Seviyesi ve Anti-TNF'in Etkisi

AS'li olgularda hem periferik kan, hem de kolon lamina propria'sında Th1 sitokin (IL-2 ve IFN-γ) ekspresyonunda bozulma olduğu, bunun yüksek TNFα konsantrasyonlarının T hücreleri tarafından IL-2 ve IFN-γ üretimini bozmasından kaynaklandığı, barsaklarda T hücrelerinin bakterilere karşı savunmasının bozulması sonucu kronik inflamasyon ve otoimmunite ortaya çıktığı düşünülmektedir (Rudwaleit ve ark, 2001).

Braun ve arkaşları yaptığı bir çalışmada 5 AS'li hastanın sakroiliak eklemlerinden bilgisayarlı tomografi (CT) eşliğinde biyopsi alınmış (Braun ve ark., 1995). Aktif hastalığı olan bu beş hastanın sakroiliak ekleminde T hücreleri ve makrofajlar gösterilmiştir. Bu çalışmadaki sakroiliak eklemde TNF-α'nin overekspresyonunu gösteren bulgular SpA'lerde çok etkili olan TNF-α blokerlerin kullanımı için kuvvetli ve mantıklı biraçıklama sağlamıştır (Zou ve ark., 2005). Anti-TNF tedaviler ile Th1 yanıtlarında düzelme sağlanması da bu bulguları destekler niteliktedir (Sivrioğlu, 2005). Aşırı TNFα ekspresyonu ile karakterize bir transgenik fare modelinde insandaki hastalığa çok benzeyen bir spondilit geliştiği gösterilmiştir. TNF

antagonistleri AS'deki iltihabı, hem insanda, hem aşırı TNF eksprese eden farelerde, ciddi şekilde azaltır (Armaka ve ark., 2008).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Çalışmamız Mart 2011-Haziran 2012 tarihler arasında İbni Sina Hastanesi Romatoloji bölümüne başvuran, Modifiye New York Kriter ile Ankilozan Spondilit tanısı almış 152'sı erkek, 66'sı kadın, toplam 218 hasta ve kendisinde ve ailesinde romatizmal, genetik, hastalık öyküsü olmayan gönüllü olur formlarını imzalamış 100'u erkek, 96'sı kadın, toplam 196 kontrol çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil etme kriterleri şunlardır;

a) Hasta Grubu:

- İbni Sina hastanesine müraacat edenler
- Modifiye New York Kriter'ile Tanı alanlar
- Tedavi alan ve tedavi almayanlar
- Gönüllülük formun imzalayanlar

b) Sağlıklı gurup:

- Kendisinde ve ailesinde, her hangi bir romatizmal hastalık olmayan
- Gebelik geçirmeyen ve psikolojik hastalığı olmayan.
- Bilinen bir genetik hastalığı olmayan.
- Gönüllülük formun imzalayan sağlıklı bireyler.

2.2. DNA İzolasyonu:

Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı kontrolerin yaklaşık 4,5 ml periferik venöz kanları %10'luk EDTA'lı tüplere alındı. Bu hastalarda DNA izolasyonu 'QIAGEN Gentra purgene' DNA purfikasyon kiti kullanarak yapıldı. Elde edilen DNA, moleküler teknikler için kullanılmaya hazır durumda idi.

2.2.1. Gereklı Malzemeler:

- DNA izolasyon kiti (QIAGEN Gentra purgene)
- Mikrosantrifüj
- Termomikser (65^oC için ısı bloğu)
- Tek kulanımlık eldiven
- Pipet ve pipet ucu
- Vorteks
- 1,5 ve 2 ml'lik eppendorf tüpleri
- %70'lik Etanol
- %100'lük İzopropil Alkol

2.2.2. DNA'nin Elde Edilmesi:

DNA elde etmek için Aşağıdaki aşamalar sırayla yapıldı:

- Çalışacak hasta sayısı kadar 1,5 ve 2 ml'lik reaksiyon tüpü (eppendorf) hazırlanır.
- Hazırlanan eppendorfların üzerine hasta isimleri, numaraları ve tarıh yazılır.
- Isı bloğu 65^o C'ye ayarlanır.

- 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1350 µl kadar RBC lizis solusyonu kondu.
- Üzerine 450 µl alt-üst edilmiş kan örnekleri eklendi.
- Karışım bir kez daha alt-üst edilerek 40 sn 14500 rpm'de santrifuj edildi.
- Santrifüj sonrası pellete zarar vermeden 10 µl kadar kalacak şekilde üstteki kısım atıldı.
- Pellet ile kalan kısım, tamamen çozülene kadar vortekslendi.
- Üzerine 450 µl cell lyzis solusyonu kondu.
- Tekrar 20 sn vortekslendi.
- Üzerine 150 µl precipititasyon solusyonu eklendi.
- 14500 rpm'de 1 dk 40 sn santrifüj edildi.
- Hazirlanan 1,5 ml'lik tüplere %100'lük izopropil alkolden 450 µl eklendi.
- Santrifüjlenen 2 ml'lik tüplerdeki süpernatant 1,5 ml'lik tüplerdeki izopropanolun üzerine dökülerek tüpler çalkalandı ve DNA'ların oluşması sağlandı.
- Tüpler tekrar 14500 rpm'de 1 dk 40 sn santrifüj edildi. Bu aşamada DNA küçük beyaz pellet halinde görünür.
- Oluşan süpernatant döküldü ve kalan peletin üzerine 450 µl %70'lik Etanol ilave edilerek dipte çöken DNA hareketlendirildi.
- 14500 rpm'de 1 dk 30 sn santrifüj edilerek süpernatant döküldü ve tüplerde kalan sıvı kurutma kağıdı ile alındı.
- Kurutulmuş tüplere 150 µl DNA hidratasyon solusyonu eklenerek 65 ^{o}C'ye ayarlanmış termalmikserde 5 dk bekletildi, ve -20^{o} C saklandı.

-20 ^{o}C'da saklanan hasta ve sağlıklı DNA'ların kalitesin belirlemek için %1.5'luk Agaroz jele yüklenerek, 150 V'da yaklaşık 15 dakika yürütüldü ve ultraviyole ışık altında DNA bantları değerlendirildi. Elde ettiğimiz DNA'lar -20^{o}C PCR-RFLP yöntemlerinde kullanılmak üzere saklandı.

2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR, Polimeraze Chain Reaction kelimelerinin baş harflerinden oluşan bir kısaltmadır ve Türkçe'de Polimeraz Zincir Reaksiyonu anlamına gelmektedir. PCR ilk defa 1985 yılında Celera genomics calışanı Carry Mullis tarafından tanımlanmış ve günümüze kadar birçok defa geliştirilerek kullanılmaya devam edilmiştir. PCR her hangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir invitro DNA sentezi yöntemidir ve DNA'nın dizi analizi, DNA haritalanmasında, genetik hastalıklar teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, v.b.) DNA parmak analizinde, insan evrimi araştırılmalarında, insan Genom projesi'ndeki araştırmalarda, allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık, babalık tayini) gibi bir çok çalışmada kullanılmaktadır. PCR esnasında Tag DNA polimeraz kullanılarak özgül DNA dizinlerinin üç basamaklı bir reaksiyonla sentezlenerek çoğaltılır.

Bu basamaklar, DNA'nın yüksek sıcaklıkda iki zincirinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon), Primer bağlanması (Annealing) ve Zincir uzatılması (Extention) dir, bu adımlar farklı sıcaklıklarda gerçekleşmektedir, Denatürasyon 94-98^{O}C arasınsa, hibridizasyon 37-65^{o}C arasında, polimerizasyon ise 72^{o}C da gerçekleşir. Bu üç aşamadan oluşan tek bir döngü, istenilen sayıda (yaklaşık 35-40 kez) tekrarlanır ve hedef DNA'nın istenilen bölgesi her döngüde yaklaşık 2 katına çıkar, böylece başlangıçtaki tek bir DNA/RNA molekülünün sayısı reaksiyon sonunda 2^{35}-2^{40} arttırılmış olur. Günümüzde PCR yöntemlerin modifiye edilerek Nested-PCR, Real-PCR gibi ondöetten fazla PCR çeşidi geliştirilmiştir.

2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Hazırlanması:

- PCR tüpleri hazırlandı.
- Karışım (MİX) aşağıdaki sıraya göre hazırlandı.

- Distile su
- 10x Buffer; uygun PH ve iyon koşularını sağlayan tampon karışımıdır, içeriği 500 µM KCL, 100 µM Tris-HCL ve 15 µM $MgCl_2$, den oluşur (Fermentas, Litvanya).
- dNTP'ler; son konsatrasyonları 2 µM olacak şekilde ortamda bulunması gereken dTTP, dCTP, dATP, dGTP bazlardır (Fermentas, Litvanya).
- Çoğaltılacak bölgeyi çevreleyen primer çifti; genelikle 18-20 nükleotid uzunluğunda olurlar ve kalıp DNA'ya sağdan ve soldan bağlanarak DNA polimerazın senteze başlaması için gerekli serbest 3' ucunu sağlarlar. son konsantrasyonları 1 µM olmalıdır (Metabion İnternational AG-Almanya).
- Magnezyum Klorür (Fermentas, Litvanya)
- Taq polimeraz; ısıya dayanıklı bir DNA polimerazdır, ve Thermus Aquaticus'dan elde edilir (Fermentas, Litvanya).

- Hazılanan karışımdan her PCR tübüne 22, 5 µl konuldu.
- Ardından her hasta tübüne, o hastanın DNA örneğinden 2, 5 µl eklendi.
- Termal-cycle'in sıcaklığı kulandığımız enzime göre ayarlandı ve örnekler yüklendi.

Termalcycle'da yaklaşık 2 saat, yani 35 siklusun sonunda 25 µl PCR ürünü hazırlandı.

Bizim yaptığımız çalışmada *STAT*3, *JAK* II ve *TNFRSF1A* genlerin Termal-Cycle'de ayarlanan sıcaklıkları şöyledir:

*STAT*3: Denatürasyon 95 ^{o}C, Annealing 57 ^{o}C, Extention 72 ^{o}C

JAK II: Denatürasyon 95 ^{o}C, Annealing 57 ^{o}C, Extention 72 ^{o}C

TNFRSF1A: Denatürasyon 95 ^{o}C, Annealing 62, 5 ^{o}C, Extention 72^{o}C

Bu çalışmada kullanılan primer çiftleri ve PCR koşuları aşağıda verilmiştir:

***STAT*3**'deki 'rs8074524' polimorfizmini belirlemek için kullanılan primer çiftleri şunlardır.

Forward primer 5′-GTCTGGAAAGCTCCATCTGC-3′

Reverse primer 5′-AGAGGCCAGATTAGTGCTGG-3′

Bu primerler gen içerisinde 419 bç'lik, aşağıda gösterilen bölgeyi çoğaltmamızı sağladı (Şekil 2.1).

GTCTGGAAAGCTCCATCTGCccctcagggttgtctgccctcatttatactatttgatctcccaggcactagcagct
gtgaacttcagttctttgcacaaagctgtcctgagctgcagagacttttcagcataacctttcccacctgaccctagactaatgccac
cttgtgtcccttctttccctagattatgtaaaagtttaacagcctccacgtggtctgagcattctattcCggcctggtcatatctcttaga
taacttctctgcatgcaggaaccgagcctgtgtagtctttgcatggtgtccagcctaaataccaatatcaccaagtctttaaagaaca
tggagactgctaatgcttgtggttccaaagccaaaggttatatctcttattcctaCCAGCACTAATCTGGCCTCT

Şekil 2. 1. *STAT*3 geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi.

***JAK* II'**deki rs10974944 polimorfizmini belirlemek için kullanılan primer çiftleri şunlardır.

Forward primer 5′- CAAGGGTCAACTGTAGTACATAA -3′

Reverse primer 5′- CTGCTTGCTAGTGGGTGAAT -3′

Bu primerler gen içerisinde 243 bç'lik, aşağıda gösterilen bölgeyi çoğaltmamızı sağladı (Şekil 2.2).

CAAGGGTCAACTGTAGTACATAAgatctgataatctggcagtcaggtggtgagggttgatgatc
agccacatttatcaagggggttaagatttaagagcaatttaaaagggccaggtctcagacctgtgcaaggccacgag
ttaaaagtgagactatccctgagtaaaaccaggacacttaagtaaatacatcctcagtaaaacaatatatagaatgtga
aaaATTCACCCACTAGCAAGCAG

Şekil 2. 2. *JAK* II geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi.

***TNFRSF1A*'**deki R92Q (rs4149584) polimorfizmini belirlemek için kullanılan primer çiftleri şunlardır.

Forward 5'-CACTGCATGGATGTGAGTGTGTAT-3'

Reverse 5'- GTTGGTTGTCAGACCCACAGAATA-3'

Bu primerler sayesinde gen içerisinde 380 bç'lik, aşağıda gösterilen bölgeyi çoğaltdık (Şekil 2.3).

CACTGCATGGATGTGAGTGTGTATtacagagacacacacttaggggtatgTcaggaagggg
atgcagggacaggaggatgcaggactcataccccatcttctcccctcaccagaaatgggtcaggtggagatctcttc
ttgcacagtggaccGggacaccgtgtgtggctgcaggaagaaccagtaccggcattattggagtgaaaaccttttc
cagtgcttcaattgcagcctctgcctcaatgggaccgtgcacctctcctgtgagcgcagctctcctgaggccaagcc
ctctccccacccc/aggggttggccccttccccatgcggtggcacttcctttccttcccccctcctgTATTCTGT
GGGTCTGACAACCAAC

Şekil 2. 3. *TNFRSF1A* geninin forward ve reverse primerlerle çoğaltılan bölgesi.

2.4. RFLP (Restriksiyon Enzimi Uzunluluk Polimorfizmleri)

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı ikiye ayırır. İlki Hamilton tarafından keşfedilen Hind III başta olmak üzere, 200 den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan çok sayıda restriksiyon enzimi bulunmuştur.

Günümüzde 3000 üzerinde restriksiyon enzimi detaylı olarak çalışılmıştır, bunlardan 600'den fazlası ticari olarak elde edilebilir. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir.

RFLP bir yararlı yöntem olup, farklı amaçlar için kulanılabilir.

1-Kalıtım çalışması için gerekli

2-Yapısal heterozigotluğun kaybının incelenmesi (LOH)

3-Doku tiplemesinde-prenatal tanıda-babalık tayininde

4-Gen klonlamasında

5-Enfeksiyon ajanların (bakteriler, viruslar), birbirinden farklıklarının belirlenebilmesinde kullanılabilir.

Çalışmamızda 3 farklı gen üzerindeki polimorfizmleri tayin etmek için, 3 restriksiyon enzimi kullandık. Kullandığımız enzimler ve uygulandığı optimom sıcaklık değerleri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kullandığımız restriksiyon enzimleri ve optimom sıcaklık değerleri.

Gen	SNP	ENZİM	OPTİMOM SICAKLIK
STAT3	rs8074524	HPA II	37^{o}C
JAK II	rs10974944	MBO1	37^{o}C
TNFR1A	rs4149584	BSTNI	60^{o} C

Enzimlerin tanımlama bölgeleri aşağıdaki çizelgedaki gibidir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kullandığımız enzimlerin tanıdığı bölgeler.

HPAII	MBO1	BSTNI
5′…C▼C G G…3′ **3′…G G C▲C…5′**	5′…▼G A T C…3′ 3′… C T A G▲…5′	5′…C C▼W G G…3′ 3′…G G W▲C C…5′

Çalışmamızda kullanılmak için PCR ile çoğaltığımız bölgeleri restriksiyon enzimler'ile muamele edilerek kesildi. Her enzime özgül, yaptığımız aşamalar, detaylı şekilde şöyledir:

HPA II'le Kesim:

PCR'ile çoğalmış olan kromozom17 q21.2'deki 419 bç'lik bölge, HPA II 'ile kesildi.Reaksiyon tüpüne

- Distile su
- PCR ürünü
- HPA II enzimi (New England Biolabs)
- Buffer (New England Biolabs)

Konuldu, ve 12-16 saat boyunca 37^{o}C'de enkube edildi. Bu pozisiyonda C nükleotidini taşıyan bireylerde 234 ve 185 baz çiftlik 2 band oluşması, T nükleotidini taşıdığında ise 419 bç'lik tek band görünmesi beklenmektedir.

MBO1 ile Kesim:

PCR ile çoğalmış olan kromozom 9 p24.1 lukusundaki 243 bç'lik bölge, MBO1 'ile kesildi. Reaksiyon tüpüne

- Distile su
- PCR ürünü
- MBO1 enzimi (New England Biolabs)
- Buffer (New England Biolabs)

konuldu, ve 12-16 saat boyunca 37^{o}C'de bekletildi. Bu pozisiyonda C nükleotidini taşıyan bireylerde 185 baz çiftlik band oluşması, G nükleotidini taşıdığında ise 243 bç'lik tek band görünmesi beklenmektedir.

BSTNI ile Kesim

PCR ile çoğalmış olan kromozom 12 p13.31 lukusundaki 380 bç'lik bölge, BSTNI 'ile kesildi. Reaksiyon tüpüne

- Distile su
- PCR ürünü
- BSTNI enzimi (New England Biolabs)
- Buffer (New England Biolabs)

konuldu ve 12-16 saat boyunca 60^{o}C'de bekletildi. Bu pozisiyonda G nükleotidini taşıyan bireylerde 304, ve 76 baz çiftlik 2 band oluşması, A nükleotidini taşıdığında ise 152 ve 76 bç'lik bandlar görünmesi beklenmektedir.

Bu pozisiyonda, baz değişikliği, farklı amino asit kodlamasına sebep olur, bu yüzden bu değişikliği Arjinin'ne tekabül eden "CGG" nükleotidi yerine arjininin, kısaltması olan "R" veya "Arg" ,ve "CAG" yerinede, Glutamin'e karşı gelen "gln" ya "Q" kullanılır.ve polimorfizimin ismi "R92Q" diye geçer.

Elde edilen kesim ürünleri %3'lu agaroz jel elektroforezi yapılarak incelenmiştir.

2.5. SSP Yöntem ile HLA-B27 Tayini

PCR-SSP incelenen lokusta alele özgü primerler kullanılarak amplifikasyonun varlığını araştıran bir yöntemdir. Deneyde kullanılan primerler, hangi alel için hazırlanmışlar ise DNA nın o aleli taşıyan kısmına bağlanarak (annealing) PCR reaksiyonun başlamasını sağlarlar. O deney tübünde primerin özgün olduğu DNA segmenti varsa çoğalma (amplifikasyon) gerçekleşir. PCR reaksiyonunun çalıştığından emin olmak için her reaksiyon tüpüne internal kontrol amacıyla polimorfik olmayan hücresel bir proteini kodlayan gene özgün bir primer seti daha eklenir Böylece pozitif reaksiyon olan tüplerde iki adet PCR ürünü görünür hale gelirken, negatif olarak değerlendirilen reaksiyonlarda sadece internal kontrol için kullanılan genin amplifiye olduğu görülür. Değerlendirme aşamasında bilgisayar programlarına gereksinim vardır. Amplifikasyondan sonra oluşan amplikonların (Çoğaltılan gen ürünü) gösterilmesi için genellikle jel veya benzeri bir ortamda elektroforez işlemi gerektirir.

2.5.1. HLA-B27'in Belirlenmesi

Bu çalışmada DNA izolasiyonu, HLA kitinin (Olerup SSP) protokolüne uygun olarak (QIAGEN) çalışıldı.Kitden Stripler ve master mix çıkarılır. Her stripte üç hasta çalışıla bilir. Hasta sayısına göre stripler ve mix hazırlanır. Bir strip için 24µl master mix, 40 µl distile su ve 2 µl taq polimeraz enzimi karıştırıldı ve her kuyucuğa 8 µl dağıtıldı. Plaka striple kapatılarak Termal-cycle'e konuldu ve verilen PCR protokolü uygulandı.

Uygulandığımız PCR protokolu şu şekldeydi:

1- 1 döngü	94^{o}C	2 dakika	Denaturasyon
2- 10 döngü	94^{o}C	10 saniye	Denaturasyon
	65^{o}C	60saniye	Annealing
3-20 döngü	94^{o}C	10 saniye	Denaturasyon
	61^{o}C	50saniye	Annealing
	72^{o}C	30 saniye	Uzatma (extention)
4- Bitiş	4^{o}C	bekletilir	

Örnekleri termal-cycle'den çıkardıktan sonra agaroz jelde yürütüldu ve sonuçlar değerlendirildi.

2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Ayırıcı bir matriks olan agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, DNA veya RNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılmasına denir. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Ayırıcı matriks olan agaroz jeli agaroz ve tampondan oluşmaktadır. Bu yöntem kullanılarak PCR ürünlerinin, izole edilen DNA'ların, restriksiyon enzim kesimi sonucu oluşan ürünlerin, sekans işlemi için hazırlanan ürünlerin boyutlarının kontrolü ve yoğunluğu belirlenebilmektedir. 200-50,000 bç

boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta Agaroz jel elektroforezi kulanılmaktadır. Agaroz bir Alg türünden elde edilir.

Agaroz incelenecek olan bantların büyüklüğüne göre, ağırlık/hacim oranına göre jel elektroforez tamponuna koyulmuş agaroz çözeltisi 50 dereceye kadar soğutularak jel tepsilerine dökülür. Ayrımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve elektriksel alanda yürütülerek ayrımı yapılır. Örnekler; yüklendikten sonra elektrik akımı altında yürütülerek, Ultraviyole ışık altında DNA'ya bağlanan Etidiyum Bromid parlamasıyla incelenir. Sonuçlar bir kamera yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılarak fotoğrafları çekilir.

2.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Çalışmamızda PCR ürünlerinin kalitesini gözlemlemek için %2'lik agaroz jel ve RFLP sonuçlarını gözlemlemek için %3'lük Agaroz jel kullandık.

%2'lik Agaroz jel hazırlanması:

Agaroz (Sigma, ABD) 2gr

Tris-Borik asit-EDTAn (TBA) 0,1x 100 ml

Etidium Bromidn (EtBr), (S Sigma, ABD) 5 µl (%1)

%3'lik Agaroz jel hazırlanması:

Agaroz (Sigma, ABD) 3gr

Tris-Borikasit-EDTA (TBA) 0,1x 100 ml

Etidium Bromid (EtBr), (S Sigma, ABD) 3 µl

- İki farklı konsantrasyondaki jel için gerekli miktarda agaroz tartıldı.
- Erlene kondu.

- Gerekli ölçüdeki TBE eklendi.
- Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye) örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ısıda çalıştırıldı.
- Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı.
- Kaynamaya başladıktan sonra mikrodalgadan çıkarıldı.
- EtBr eklenip, erlen çalkalandı.
- Hazırladığımız jel tabağa (QWL Scintific, ABD) dökülüp, 30 dk polimerize olması için bekletildi.

2.6.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi:

Çalışmamızda PCR ve RFLP ürünlerinin için kullandığımız 6x, 100 mL yüklü Çözeltimizin (Loading Buffer) içeriği şöyledir:
Bromfenol Mavisi 0,25 g
Ksilen Siyanol 0,25 g
Gliserol 30 ml
Distile su ile 100 ml'e tamamlanır.

2.6.2.1. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi:

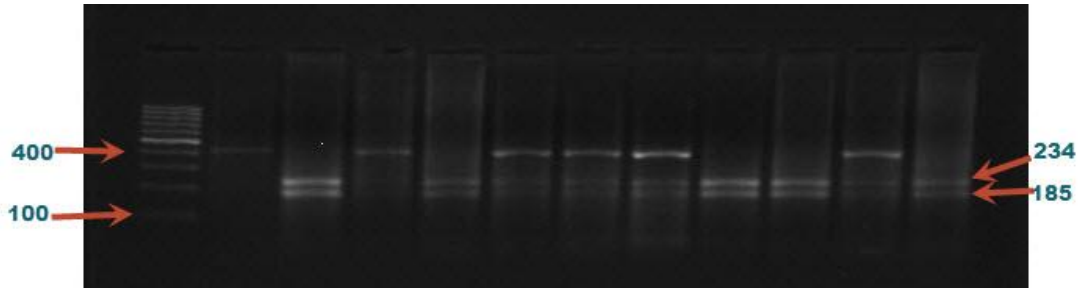
- Yüklenecek örnek sayısı kadar yaklaşık 1 µl'lik 6x yükleme tampon parafilm üzerine kondu.
- 8 µl PCR ürünü yükleme tamponu ile parafilm üzerinde karıştırıldı.
- Elektroforez tankının (Wealtec, Tayvan) içine yerleştirilmiş jelin tarakları çıkarıldıktan sonra oluşan kuyucuklardan ilkine yaklaşık 4 µl x174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker (Fermentas, Litvanya) yüklendi.
- Yükleme tamponuyla muamele edilmiş örnekler de diğer kuyucuklara eklendi.
- 150 V'da 10 dk yürütüldü.

- Ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında etidiyumbromidin parlamasıyla sonuçlar göründü ve fotoğraflandı (Alpha Imager, ABD).

2.6.2.2. RFLP Ürünlerinin Jele Yüklenmesi:

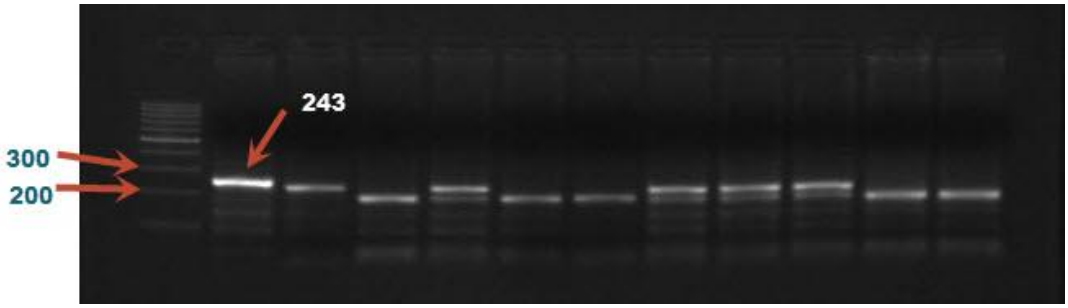
- Enzimlerimizle muamele ettiğimiz örnekler yaklaşık 4 µl yükleme tamponuyla muamele edildi.
- Örnekler kısa bir sure santrifüj edildi.
- Hazırlanan %3'lük jelin ilk kuyucuğuna marker, daha sonrakı kuyucuğa kesilmemiş ve yükleme tamponu ile muamele edilmiş örnek kondu.
- RFLP ürünleri de daha sonraki kuyucuklara kondu.
- 150 V'da 30 dk yürütüldü.
- Ultraviyole ışık altında sonuçlar göründü ve fotoğraflandı.

Yaptığımız çalışmamızda *STAT* 3 geninin T/T homozigot durumunda HPA II enzimi ile muamele edilmiş ürünümüz, PCR ile çoğatılmış ve kesilmemiş ürünle aynı büyüklükte (419 çb) ve tek bant görülmektedir. Örneklerin C/C homozigot durumunda 185 çb ve 234 çb iki bant görülmektedir. C/T heterozigot durumda ise T aleline ayit 419 ve C alelin göstergesi olan 185 ve 234 uzunluğunda üç bant görünür (Şekil 2.4).



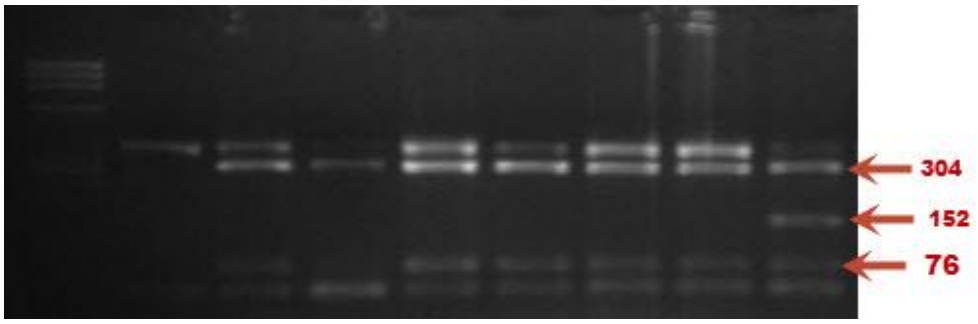
Şekil 2. 4. *STAT* 3 geni, HPAII enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; soldan 1 marker, 2 pcr ürünü, 3,5,9,10, 12 CC (homozigot), 6,7, 8, 11 CT (heterozigot), 4 TT (uncut).

JAK II geninin MBOI enzim ile kestik G/G homozigot durumunda, PCR ile çoğatılmış ve kesilmemiş ürünle aynı büyüklükte (243 çb) ve tek bant görülmektedir. Örneklerin C/C homozigot durumunda 185 çb boyutunda tek bant görülmektedir. C/G heterozigot durumda ise G aleline ayit 243 ve C alelin göstergesi olan 185 uzunluğunda iki bant görünür (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. *JAK* II geni Mbo I enzimi ile kesimi sonrası *JAK* II geni Mbo I enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; 1 marker, 2 pcr ürünü, 3 GG (uncut), 4,6,7,11,12, CC (homozigot), 5,8,9,10 CG (hetrozigot).

TNFRSF1A geninde R92Q polimorfizmine bakmak için PCR ürünlerimizi BSTNI enzim ile muamele etdik, bu mutasiyonda CGC yerine CAG geldiğinde, bu gen Arjenin yerine Glutamin kodliyor, bu yüzden burda protein değişikliği olduğunda pozitif ve aksi taktirde negatif olarak sonuçliyoruz, R/R örneklerde 152 ve 304 uzunluğunda iki bant, örneklerimizde R/Q mutasiyonu var ise 76, 152 ve 304 uzunluğunda üç bant göülür. (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. *TNFRSF1A* geni R92Q polimorfizminin BSTN I enzimi ile kesimi sonrası %3'lük agaroz jeldeki elektroforez görünümü; 1 marker, 2 pcr ürünü, 3,4,5,6,7,8, R/R, 9 R/Q.

2.7. İstatiksel Analiz

Hasta ve kontrollerdeki genotipler ve allel sıklıkları Binary Logistik Regression modeli kullanılarak karşılaştırılmış ve Odds Ratio değerleri hesaplanmıştır. Anlamlılık düzeyi %95 güven aralığında 0.05 olarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR

Çalışma kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesindende Modifiye New York kriterine gore tanı almış 218 Ankilozan Spondilit hastası ve kendisinde ve ailesinde otoimmüne bir hastalık hikayesi olmayan 196 sağlıklı birey incelenmiştir. Hastalar 16-78 yaşları arasındadır ve yaş ortalaması 38.82 dir. Cinsiyetlere gore hastalar, 152 erkek, 66 kadın olarak dağılmışlardır. Çalışmamıza katılan 196 sağlıklı kontrolün yaşları 17-61 arasındadır ve yaş ortalaması 33.58'dir. Cinsiyetlere gore dağılımları 100 erkek, 96 kadın şeklindedir. Hastaların bariz bulgularının yüzdeleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Ankilozan Spondilit hastanın yaş /cinsiyet ve görülen semptom yüzdeleri

Klinik bulgular, HLA-B27 ve yaş/cinsiyet	Sıklık
Yaş ortalaması	38.82
Cinsiyet	152E/66K
HLA-B27	%75.7
Periferik Arterit	%48
Entezit	%40
Üveit	%22

Ankara Üniversitesi İmmünoloji laboratuvarın çalışmaya dahil edilen toplam 412 AS hastası ve sağlıklı kontrolde *JAK* II genindeki rs10974944, *STAT* 3 geninde rs8074524, ve *TNFRSF1A* geninde R92Q (rs4149584) polimorfizmleri incelenmiştir.

JAK II genindeki rs10974944 SNP'i incelendiğinde; 218 AS hastasında C/C genotipi 92 kişide %42 oranında, C/G genotipi 112 kişide %51 oranında G/G genotipi 14 kişide %6 oranında saptandı. 196 sağlıklı kontrolde C/C genotipine sahip 79 kişi %40 oranında, C/G genotipine sahip 100 kişi %51 oranında ve G/G genotipine sahip 17 kişi %8 oranında saptandı. (Çizelge 3.2). Alel sayılarına bakdığımızda hastalarda C aleli 296 ile %67 ve G aleli 140 ile %32.11 oranında görülmüşken, sağlıklı gurupta C aleli 258 kromozomda %65 oranında, G ise 135 ile %34 oranında bulunmuştur. İstatistiksel olarak bakıldığında genotip ve allel sıklıkları açısından hastalar ve sağlıklılar arasında anlamlı bir fark bulunamamışır (çizelge 3.2). Bu veriler ışığında C alelinin yaygın alel olduğunu ve C/C ve C/G oranlarının hasta ve kontrollerde sıklığının %90'ın üzerinde olduğunu belirledik.

Çizelge 3.2. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı grubu genotip oranlarının karşılaştırılması

JAK II rs10974944	Ankilozan Spondilit hastası		Sağlıklı kontrol grubu		OR	P	95% CI
	(n=218)	%	(n=196)	%			
Genotip							
GG	14	6	17	8	0.72	0.38	0.35-1.51
CG	112	51	100	51	1.01	0.94	0.69-1.49
CC	92	42	79	40	1.08	0.69	0.73-1.60
Allel							
G	140	32.11	135	34,35	0.90	0.49	0.68-1.21
C	296	67.88	258	65,64	1.08	0.69	0.73-1.60

STAT 3 geninde rs8074524 SNP incelendiğinde; C/C genotipi 218 AS hastasında 139 kişide %63 oranında, C/T genotipi 52 kişide %23 oranında ve T/T genotipi 27 kişide %12 oranında saptandı. 196 sağlıklı kontrolde C/C genotipi 131 kişide %66 oranında, C/T genotipi 59 kişide %30 oranında ve T/T genotipi 6 kişide %3 oranında saptandı (Çizelge 3.3). Alel sayılarına bakdığımızda hastalarda minor alel olan T 106 kromozom ile %24,31 oranında, C ise 330 ile %75,68 oranında bulunmuşken, bu sayı sağlıklı grubumuzda T aleli için 71 ile %18,11 ve C alelinde 321'le %81,88

oranlarındadır. Bu veriler ışığında C/C genotipinin %63'luk oranla çalışmamıza katılan AS hastaları arasında en sık dağılıma sahip genotip olduğunu belirledik. AS için risk artışı getirdiğini düşündüğümüz T/T genotipi C/C ile kıyasladığında OR: 4.24 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirdiğimizde ise T/T genotipinin AS için risk artışı getirdiği ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür (OR=4.24, p=0.001 %95 CI:1.70-10.60).

Çizelge 3.3. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı grubu genotip oranlarının karşılaştırılması

T

STAT3 rs8074524	Ankilozan Spondilit hastası		Sağlıklı kontrol grubu		OR	P	95% CI
1 9 6	(n=218)	%	(n=196) Genotip	%			
TT	27	12	6	3	**4.24**	0.001	1.70-10.60
CT	52	23	59	30	0.83	0.41	0.53-1,29
CC	139	63	131	66	1	1	
			Allel				
T	106	24.31	71	18.11	1.45	0.29	1.04-2.04
C	330	75.68	321	81.88	0.69	0.29	0.49-0.97

STAT 3 genindeki rs8074524 polimorfizmi genotip dağılımları B27 pozitifliği açısından incelendiğinde TT genotipine sahip 27 kişide B27 pozitifliği 17 (%63), C/T genotipindeki 52 kişide 37 (%72) ve C/C genotipindeki 139 kişide 111 (%80) olduğu görülmüştür, böylece bu polimorfizmin, HLA-B27'den bağımsızdır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Ankilozan Spondilit hastalarında, *STAT*3 alleleri ile HLA-B27 pozitiflik oranı

STAT3 Alleleri	n=218	n=HLA-B27 Pozitifliği	%
TT	27	17	63
CT	52	37	72
CC	139	111	80

TNFRSF1A geninde rs4149584 polimorfizmi incelendiğinde amino asit değişikliği yapan R92Q R/R genotipi; 218 AS hastasından 210'unda %96 oranında saptandı. R/R genotipi 8 kişide %3 oranında saptandı. Sağlıklı kontrol grubunda R/R genotipine sahip 188 kişi %95 oranında, R/Q genotipine sahip 8 kişi %4 oranında saptandı (Çizelge 3.5). Q/Q genotipi bu çalışma kapsamında incelenen hasta ve sağlıklı toplam 412 kişide görülmemiştir. R Allel frekansları açısından hasta ve kontrollerde incelendiğinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir

Çizelge 3.5. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı gurubu genotip oranlarının karşılaştırılması

TNFRSF1A R92Q	Ankilozan Spondilit hastası		Sağlıklı kontrol grubu		OR	P	95% CI
	(n=218)	%	(n=196)	%			
			Genotip				
RR	210	96	188	95	1	1	
RQ	8	3	8	4	0.90	0.82	0.33-2.43

Çalışmamızda hem sağlıklı kontrol grubunda hemde AS hastalarında cinsiyetlere göre genotip dağılımı değerlendirildi. *JAK*II (Çizelge 3.6) ve *STAT*3 (Çizelge 3.7) genlerde farklık görünmedi, ama *TNFRSF1A* da R/Q genotipi erkeklerde, kadınlardan yüksek olarak saptandı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.6. AS hastaları ve sağlıklı kıntrol grubunda, JAK II geninde cinsiyete genotip oranlarının karşılaştırılması

JAKII		**Genotip**					
		GG		CC		CG	
		n	%	n	%	n	%
Kadın	Kontrol	7	%7.29	43	%44.79	46	%47
	AS	4	%6	31	%46.96	31	%46.96
	Toplam	11	%6.79	74	%45.67	77	%47.53
Erkek	Kontrol	11	%10.57	37	%35.57	56	%53.84
	AS	10	%6.57	61	%40.13	81	%53.28
	Toplam	21	%8.20	98	%38.28	137	%53.51

Çizelge 3.7. AS hastaları ve sağlıklı kıntrol gurubunda, *STAT* 3 geninde cinsiyete gore genotip oranlarının karşılaştırılması

STAT3		**Genotip**					
		TT		CC		CT	
		n	%	n	%	n	%
Kadın	Kontrol	5	%5.15	60	%61.85	32	%32.98
	AS	7	%10.60	41	%62.12	18	%27.27
	Toplam	12	%7.36	101	%61.96	50	%30.67
Erkek	Kontrol	1	%0.97	72	%69.90	30	%29.12
	AS	20	%12.98	99	%64,28	35	%22.57
	Toplam	21	%8.17	171	%66.53	65	%25,29

Çizelge 3.8. AS hastaları ve sağlıklı kıntrol gurubunda, *TNFRSF1A* geninde cinsiyete göre genotip oranlarının karşılaştırılması

TNFRSF1A		**Genotip**			
		RR		RQ	
		n	%	n	%
Kadın	Kontrol	93	%96.87	3	%3.12
	AS	66	%100	0	%0
	Toplam	159	%98.14	3	%1.85
Erkek	Kontrol	96	%95.04	5	%4.95
	AS	144	%97.73	8	%5.26
	Toplam	240	%94.86	13	%5.13

4. TARTIŞMA

İnflamatuar spondiloartropatilerin en yaygın biçimi olan Ankilozan Spondilit bir çok genetik ve çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle oluşan bir hastalıktır. Hastalığın bir MHC Sınıf I molekülü olan HLA-B27 ile birlikteliği uzun yıllardır bilinmektedir. İngilterede yapılan bir çalışmada tek yumurta ikizlerinde hastalık uyumu %75 iken çift yumurta ikizlerinde bu oran %13'e kadar düşmektedir. B27 açısından uyumlu çift yumurta ikizlerinde bile AS uyumunun %27 olması hastalığın diğer genetik değişikliklerinde etkisi altında olduğunu göstermektedir (Brown ve ark., 1997). B27 dışında hastalığa yatkınlık yaptığı düşünülen pek çoğunun göreceli olarak düşük etkisi olan bir çok gen olduğu düşünülmektedir. Son 5 yılda genom wide association çalışmaları ile AS'in poligenik doğası doğrulanmakta ve hastalıkla ilişkili olabilecek bir çok potansiyel gen tanımlanmaktadırlar (Burton ve ark., 2007; Evans ve ark., 2011).

Biz bu çalışmada, GWAS çalışmalarında AS ile ilişkilendirilen ve fonksiyonları nedeniyle oynadıkları muhtemel patojenik roller dolayısıyla AS yatkınlık yapabileceğini düşündüğümüz üç gende *STAT* 3, *JAK* II ve *TNFRSF1A* vaka-kontrol genotiplendirme çalışması yaparak genlerin AS'le ilişkilerini araştırdık.

Çalışma kapsamında toplam 218 hasta ve 196 sağlıklı bireyde yaptığımız incelemede *TNFRSF1A* genindeki rs4149584 R/Q değişikliği hastalıkla birliktelik göstermemiştir. R92Q R/R genotipi; 218 AS hastasının 210'unda %96 oranında bulunmuştur. R/Q heterozigotluğuna 8 kişide %3 oranında rastlanmıştır. Bu sıklıklar sağlıklı kontrollerdeki R/R genotipi 188 kişi %95 oranı ve R/Q genotipine 8 kişi %4 oranına oldukça yakındır ve anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

AS hastalarında artmış sayıda TNF-α eksprese eden makrofaj gözlenmiştir ve anti TNF-α bloke eden ajanlar AS tedavisinde oldukça etkili olarak kullanılabilinmektedir. *TNFRSF1A*'nın GWAS çalışmalarında AS ile ilişkili bulunmuş (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille ve ark., 2010) olması TNF yolağının AS patogenezinde rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir. Yine *TNFRSF1A* geninin AS in klinik olarak ilişkili olduğu, Crohn hastalığı ve ülseratif kolitle birlikteliğinin gösterilmiş olması bu genin AS'e de yatkınlık yapabileceğini düşündürmektedir (Waschke ve ark., 2005; Lappalainen ve ark., 2008). Çinde yapılan bir çalışmada AS ile *TNFRSF1A* genin ilişkilendirilmiştir (Davidson ve ark 2011). Bizim ülkemizde AS hastalarında yaptığımız bu çalışmada *TNFRSF1A* genindeki R92Q değişikliği AS ile ilişkili bulunmasa da aynı gendeki başka değişikliklerinde taranması gerektiği unutulmamalıdır.

JAK II genindeki rs10974944 (C/G) polimorfizminde nadir allel olan G, hastalarda GG genotipinde %6 sıklıkta bulunurken sağlıklı kontrollerde %8 sıklıkta tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. (OR:0.72, p=0.30 %95CI:0.35-1.51). Allel sıklıkları kontrollerde C %66 %34 hastalarda %68 %32 oranında bulunmuştur. Aynı SNP avrupalı beyaz ırkta C%69 G%3, asyada C %78 G%22 Afrikada ise %74 %26 oranlarında bulumuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar ilgili SNP'in ülkemizdeki frekansının beyaz ırkta daha önceden bildirilmiş değerlere çok yakın olduğunu göstermektedir (NCBI-dbSNP- rs10974944, 2013).

Genotip dağılımları incelediğinde risk artışı getirdiğini düşündüğümüz *STAT* 3 genindeki rs8074524 T/T genotipinin, hastalarda %12, kontrollerde ise %3 oranında olduğu görülmüştür. Sağlıklı kontrollerde minor allel frekansı 0.18 hastalarda ise 0.24 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara gore TT genotipinin hastalık ile ilişkili olduğu görülmüştür (Çizelge 3.3).

IL23R, Th17 T lenfosit popülasyonlarının farklılaşması ve devamı için anahtar bir düzenleyici basamaktır. *IL23R* geninin AS ilişkisi Th17 hücrelerinin hastalık patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. AS'li hastaların kan örneklerinde, dolaşımdaki Th17 hücrelerinin düzeyinin artış olması bu görüşü desteklemektedir (Jandus ve ark, 2008). STAT3 ve JAK2 hücrede DNA transkripsiyonuna yol açan sinyal iletiminde yer almaktadırlar ve IL23'ün sinyalizasyon kaskatında IL23R'ünün hemen arkasındadırlar. Her ikiside CD4 pozitif Th17 hücrelerinin regülasyonunda yeralmaktadırlar ve AS'de de sıklıkla görülen İBH ile ilişkilidirler. Bu genlerdeki polimorfizmler normal olmayan Th17 fonksiyonuna dolayısıyla AS oluşumuna neden olabilecek gibi görünmektedirler.

STAT 3 geni Avrupa ve Çin popülasyonlarında yapılan çeşitli çalışmalarda AS ile ilişkili bulunmuştur (Danoy ve ark., 2010; Davidson ve ark., 2011). Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada *STAT*3 geni Crohn hastalığı ile ilişkili bulurken rs8074524 TT genotipi hastalarda %13 kontrollerde %11 sıklıkta saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı değildir (Sato ve ark., 2009). Çeşitli çalışmalarda rs8074524 için TT genotipi Avrupa popülasyonlarında 0.02-0.045 arasında değişirken bu oran Asya popülasyonunda 0.11 kadar çıkmaktadır. İngiltere den yapılan bir çalışmada beyaz ırkta minor allel 0.19 sıklıkta bulunmuştur bizim bulduğumuz sağlıklı popülasyon oranına yakın görünmektedir. (Jamshidi ve ark., 2007).

*STAT*3 genindeki incelediğimiz SNP AS ile ilişkisi en iyi bilenen *HLA-B27* den bağımsız gözükmektedir. Rs TT genotipi ve CC genotipi taşıyan hastalarda HLA- B27 pozitifliğinin dağılımı açısından bir fark görülmemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERILER

Bu çalışmadaki sonuçlar, incelenen genlerden *STAT*3 ün, AS hastalığına yatkınlık yaptığı görüşünü desteklemektedir. Elde ettiğimiz veriler incelenen rs değişikliğinin hastalarda yaklaşık 4 kat yüksek olduğunu göstermektedir. Bu değişikliğin genin fonksiyonunda nasıl bir etki yaptığı ve hastalık oluşumunu nasıl etkilediği açık değildir. Literatürde *STAT* 3 geninin AS ve benzer klinikteki hastalıklar için yatkınlık yaptığı gösterilmiştir ve bizim çalışmamız da bunu desteklemektedir. Hastalığı yatkınlık yapan genlerin belirlenmesi olası ilaç tedavileri içinde muhtemel hedeflerin belirlenmesine yol açarak kliniğe yansıyabilecek etkiler içermesi açısından önemlidir.

ÖZET

Spondiloartropati Hastalarında, *JAK2, STAT3, TNFRSF1A* Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

Spondiloartropatinin en anlaşılmış türü olan Ankilozan spondilit (AS) hastalığı, etyopatogenezi tam olarak bilinmeyen, kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. İkiz çalışmalarında *HLA-B27* geni başta olmak üzere, genetiğin hastalık üzerinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Geniş genom taramaları (GWAS) son yıllarda hastalıkla ilişkili birçok gen belirlemiş ve MHC dışı genlerin de hastalık patogenezinde rolü olduğu öne sürülmüştür.

Biz bu çalışmada, GWAS çalışmalarında AS ile ilişkilendirilen ve fonksiyonları dolayısı oynadıkları muhtemel patojenik rollerin AS yatkınlık yapabileceğini düşündüğümüz üç gende; *STAT 3, JAK II ve TNFRSF1A* vaka-kontrol genotiplendirme çalışması yaparak genlerin AS'le ilişkilerini araştırdık.

Çalışmaya toplam 218 hasta ve 196 sağlıklı kontrol dahil edildi. *JAK II* genindeki rs10974944, *STAT 3* geninde rs8074524 ve *TNFRSF1A* geninde R92Q (rs4149584) polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemlerini kulanarak araştırdık.

TNFRSF1A genindeki rs4149584 R/Q ve *JAK II* genindeki rs10974944 (C/G) polimorfizmler incelendiğinde, hasta ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Bu değer *TNFRSF1A* için OR=0.90 p=0.82 CI=0.33-2.43 ve *JAK II* için OR=0.72, p=0.30 CI=0.35-1.51.). *STAT 3* genindeki rs8074524 (C/T) polimorfizminin, hastalar ve sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında *HLA-B27*'den bağımsız olarak AS'e yatkınlık yaptığı bulunmuştur (OR=4.24, p=0.001 %95 CI=1.70-10.60). Elde ettiğimiz veriler incelenen rs8074524 değişikliğinin hastalarda yaklaşık 4 kat yüksek olduğunu göstermekte ve *STAT3* geninin AS yatkınlık yapan risk faktörlerinden biri olabileceğini göstermektedir. Hastalığı yatkınlık yapan

genlerin belirlenmesi olası ilaç tedavileri içinde bu genlerin hedeflenmesine yol açarak kliniğe yansıyabilecek etkiler içermesi açısından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Ankilozan Spondilit, *JAK*2 polimorfizmi , STAT3 polimorfizmi, *TNFRSF1A* polimorfizmi

SUMMARY

Study of *JAK2, STAT*3 AND *TNFRSF1A* Polymorphisms in Patients with Spondyloarthropathy

Ankylosing spondylitis is a chronic inflammatory disease of which type of Spondyloarthropathies, and its etiopathogenesis has yet remain unclear. AS is type of Spondyloarthropathies. Twin studies confirm that susceptibility to AS is, especially for the *HLA-B27* gene, entirely genetically. In recent years, Genome-wide association study (GWAS) identified several genes associated with the disease and role of non-MHC genes in AS pathogenesis has been suggested.

In this study we planned to investigate three genes, *STAT 3, JAK II* and *TNFRSF1A* which were found associated with AS susceptibility by GWAS studies and also the functions of these proteins might probably play a pathogenic role in AS . We designed a case-control genotyping study.

A total of 218 patients and 196 healthy controls were included in the study. Rs10974944 in *JAK II*, rs8074524 in *STAT3* and R92Q (rs4149584) in *TNFRSF1A* were investigated by PCR-RFLP methods.

The polymorphisms in*TNRSF1A* and *JAK II* genes did not statistically differ between patients and healthy controls. (For *TNFRSF1A* ;OR=0.90 P=0.82 CI=0.33-2.43 and for *JAK II*; OR=0.72, P=0.30 CI=0.35-1.51). T/T genotype in *STAT3* gene was significantly higher in patients (about 4-fold), compared to healthy controls (OR: 4.24, p=0.001 %95 CI:1.70-10.60). Our data shows that, *STAT*3 gene may be one of the risk factors that predispose to AS independently from *HLA-B27*.

The identification of genes that predispose to disease, may help to find potential drug treatments, by targeting these genes and clinical applications may be possible.

Key Words: Ankylosing Spondylitis, *JAK*2 polymorphisms, *STAT*3 polymorphisms, TNFRSF1A polymorphisms

KAYNAKLAR

AKKOC N, KHAN MA. Epidemiology of Ankylosing Spondylitis and Related Spondyloarthropathies. In: Weisman MH, Reveille JD, van der Heijde D, eds. Ankylosing Spondylitis and the Spondyloarthropathies. St. Louis: Mosby; 2006:117-31.

AKKOC, N., & KHAN, M. A. (2005). Etiopathogenic role of HLA-B27 alleles in ankylosing spondylitis. *APLAR Journal of Rheumatology*, **8(3):** 146-153.

ARASIL, T. Ankilozan Spondilit. Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y. FİZİKSEL TIP ve REHABİLİTASYON. Ankara: Güneş kitabevi; 2000, Cilt: 2, s.:1577-89.

ARMAKA, M., APOSTOLAKI, M., JACQUES, P., KONTOYIANNIS, D. L., ELEWAUT, D., & KOLLIAS, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine*, **205:** 331-337.

ARNETT FC, (1997). Ankylosing spondylitis. In: Koopman WJ (Ed.). Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology. Pennsylvania: Williams&Wilkins; s.:1197-208.

Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC). (2009). Genomewide association study of ankylosing spondylitis identifies multiple non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*.

Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), REVEILLE, JD., SIMS, AM., DANOY, P., EVANS, DM., LEO, P., POINTON, JJ., JIN, R., ZHOU, X., BRADBURY, LA., APPLETON, LH., DAVIS JC., DIEKMAN, L., DOAN, T., DOWLING, A., DUAN, R., DUNCAN, EL., FARRAR, C., HADLER, J., HARVEY, D., KARADERI, T., MOGG, R., POMEROY, E., PRYCE, K., TAYLOR, J., SAVAGE, L., DELOUKAS, P., KUMANDURI, V., PELTONEN, L., RING, SM., WHITTAKER, P., GLAZOV, E., THOMAS, GP., MAKSYMOWYCH, WP., INMAN, RD., WARD, MM., STONE, MA., WEISMAN, MH., WORDSWORTH, BP., BROWN, MA. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nature genetics*, 42: 123.

BAKLAND, G., GRAN, J. T., & NOSSENT, J. C. (2011). Increased mortality in ankylosing spondylitis is related to disease activity. *Annals of the rheumatic diseases*, **70:** 1921-1925.

BAL, A., UNLU, E., BAHAR, G., AYDOG, E., EKSIOGLU, E., & YORGANCIOGLU, R. (2007). Comparison of serum IL-1β, sIL-2R, IL-6, and

TNF-α levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clinical rheumatology*, **26:** 211-215.

BALL, GV. (1993) Ankylosing spondylitis. In: McCarty DJ, Koopman WJ, Ed.: Arthritis and allied conditions.12th edit Vol. 1, U.S.A Malvern: Lea&Febige; p.: 59, 1051-60.

BARR, A., & KEAT, A. (2010). Spondyloarthritides: evolving therapies. *Arthritis Research and Therapy*, **12:** 221.

BARRETT, J. C., HANSOUL, S., NICOLAE, D. L., CHO, J. H., DUERR, R. H., RIOUX, J. D., BRANT, SR., SILVERBERG, MS., TAYLOR, KD., BARMADA, MM., BITTON, A., DASSOPOULOS, T., DATTA, LW., GREEN, T., GRIFFITHS, AM., KISTNER, EO., MURTHA, MT., REGUEIRO, MD., ROTTER, JI., SCHUMM, LP., STEINHART, AH., TARGAN, SR., XAVIER, RJ., NIDDK IBD GENETICS CONSORTIUM, LIBIOULLE, C., SANDOR, C., LATHROP, M., BELAICHE, J., DEWIT, O., GUT, I., HEATH, S., LAUKENS, D., MNI, M., RUTGEERTS, P., VAN GOSSUM, A., ZELENIKA, D., FRANCHIMONT, D., HUGOT, JP., DE VOS, M., VERMEIRE, S., LOUIS, E. BELGIAN-FRENCH IBD CONSORTIUM; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, CARDON, LR., ANDERSON, CA., DRUMMOND, H., NIMMO, E., AHMAD, T., PRESCOTT, NJ., ONNIE, CM., FISHER, SA., MARCHINI, J., GHORI, J., BUMPSTEAD, S., GWILLIAM, R., TREMELLING, M., DELOUKAS, P., MANSFIELD, J., JEWELL, D., SATSANGI, J., MATHEW, CG., PARKES, M., GEORGES, M., DALY, MJ., (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*, **40:** 955-962.

BENEKLI, M., BAER, M. R., BAUMANN, H., & WETZLER, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, **101:** 2940-2954.

BOWMAN, T., GARCIA, R., TURKSON, J., & JOVE, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19:** 2474-2488.

BRAUN, J., BOLLOW, M., NEURE, L., SEIPELT, E., SEYREKBASAN, F., HERBST, H., EGGENS, U., DISTLER, A.SIEPER, J. (1995). Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, **38:**499-505.

BRAUN, J., & SIEPER, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *The Lancet*, **369:** 1379-1390.

BREWERTON, D. A., HART, F. D., NICHOLLS, A., CAFFREY, M., JAMES, D. C. O., & STURROCK, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *The Lancet*, **301:** 904-907.

BRİONEZ, T. F., & REVEİLLE, J. D. (2008). The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Current opinion in rheumatology*, **20:** 384-391.

BROWER, AC., SANOLEN, DC. (2003). Seronegative spondyloarthropathies: imaging. In: Third edition *RHEUMATOLOGY vol. 2*, Ed.: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. Edinburg: Mosby, Elsevier Limited, p.:1225-32.

BROWN, M. A., KENNEDY, L. G., MACGREGOR, A. J., DARKE, C., DUNCAN, E., SHATFORD, J. L., ... & WORDSWORTH, P. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins the role of genes, HLA, and the environment. Arthritis & Rheumatism, **40:** 1823-1828.

BROWN, M. A. (2011). Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Briefings in functional genomics*, **10:** 249-257.

BURTON, P. R., CLAYTON, D. G., CARDON, L. R., CRADDOCK, N., DELOUKAS, P., DUNCANSON, A., & GREEN, E. K. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature genetics*, 39(11): 1329-1337.

CARGILL, M., SCHRODI, S. J., CHANG, M., GARCIA, V. E., BRANDON, R., CALLIS, K. P., MATSUNAMİ, N., ARDLİE, KG., CİVELLO, D., CATANESE, JJ., LEONG DU., PANKO, JM., MCALLISTER, LB., HANSEN, CB., PAPENFUSS, J., PRESCOTT, SM., WHITE, TJ., LEPPERT, MF., KRUEGER, GG., BEGOVICH, A. B. (2007). A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to the Identification of IL23R as Psoriasis-Risk Genes. *The American Journal of Human Genetics*, **80:** 273-290.

COLBERT, R. A. (2000). HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum?. *Molecular medicine today*, **6:** 224-230.

COLBERT, R. A., DELAY, M. L., LAYH-SCHMITT, G., & SOWDERS, D. P. (2009). HLA‐B27 misfolding and spondyloarthropathies. *Prion*, 3(1): 15-26.

COLBERT, R. A., DELAY, M. L., KLENK, E. I., & LAYH-SCHMITT, G. (2010). From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunological reviews*, 233: 181-202.

ÇALIŞ, M., ÖZGÖÇMEN, S. (2011). Classification Criteria for Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. Turkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics; 4:16-22.

ÇALGÜNERI, M. (2004). Ankilozan spondilit. *T Klin İmmünol Romatol*, **4:** 29-37.

DAKWAR, E., REDDY, J., VALE, F. L., & URIBE, J. S. (2008). A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurgical focus*, **24:** E2.

DANOY, P., PRYCE, K., HADLER, J., BRADBURY, L. A., FARRAR, C., POINTON, J., TASC., WARD, M., WEISMAN, M., REVEILLE, J, D., WORDSWORTH, B, P., STONE, M, A., SPONDYLOARTHRITIS RESEARCH CONSORTIUM OF CANADA(SPARCC)., MAKSYMOWYCH, W, P., RAHMAN, P., GLADMAN, D., INMAN, R, D., BROWN, M. A. (2010). Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS genetics*, **6:** 1001195.

DAVIDSON, S. I., WU, X., LIU, Y., WEI, M., DANOY, P. A., THOMAS, G., ... & XU, H. (2009). Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis & Rheumatism*, **60:** 3263-3268.

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, PM., BROWN, MA., XU, H. (2011). Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese. *Annals of the rheumatic diseases*, **70:** 289-292.

D'AMATO, M., FIORILLO, M. T., GALEAZZI, M., MARTINETTI, M., AMOROSO, A., & SORRENTINO, R. (1995). Frequency of the new HLA-B* 2709 allele in ankylosing spondylitis patients and healthy individuals. *Disease markers*, **12:** 215-217.

DOĞANAVŞARGIL, E. (1996). Spondilartritler. In: *Klinik Romatoloji*, Ed.: Karaaslan Y, Ankara Hekimler yayın birliği, p.:175-97.

DUERR, R. H., TAYLOR, K. D., BRANT, S. R., RIOUX, J. D., SILVERBERG, M. S., DALY, M. J., ... & CHO, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. science, 314(5804), 1461-1463.

GenCards. 2013 [genecards.org]. TNF-α. Erişim: [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF]. Erişim Tarihi. 05.05.2013

ENSMBLE. 2013. [ensembl.org]. TNFRSF1A-001. Erişim: [http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g

=ENSG00000067182;r=12:6437923-6451280;t=ENST00000162749]. Erişim Tarihi 05,05,2013

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. 2013 [ebi.ac.uk]. Janus Kinase 2. Erişim: [http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/gene?term=JAK2&classification=9606&tid=nameOrgENSMUSG00000024789]. Erişim Tarihi 22,04,2013

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. 2013 [ebi.ac.uk]. Tyrosine-protein kinaseJAK2.Erişim:[http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/protein?term=JAK2&classification=9606&tid=nameOrgENSMUSG00000024789]. Erişim Tarihi 22,04,2013

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. 2013 [ebi.ac.uk]. Tumor necrosis factor .Erişim:[http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/gene?term=TNF-alpha&classification=9606&tid=synENSMUSG00000024401]. Erişim Tarihi 22,04,2013

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. 2013 [ebi.ac.uk]. TNFRSF1A. Erişim: [http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/gene?term=TNFRSF1A&classification=9606&tid=nameOrgENSMUSG00000030341]. Erişim Trihi: 22.05.2013

EREN, O., KART-KOSEOGLU, H., & ARIKAN, S. (2010). Antibody response to immunoglobulin binding protein (BIP) in ankylosing spondylitis. *Tıp Araştırmaları Dergisi* : **8 :**156 -159.

EVANS, D. M., SPENCER, C. C., POINTON, J. J., SU, Z., HARVEY, D., KOCHAN, G., ... & BUMPSTEAD, S. J. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature genetics*, **43:** 761-767.

FRANKE, A., BALSCHUN, T., KARLSEN, T. H., HEDDERICH, J., MAY, S., LU, T., ... & SCHREIBER, S. (2008). Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nature genetics*, **40:** 713-715.

FELDTKELLER, E., BRUCKEL, J., & KHAN, M. A. (2000). Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups. *Current opinion in rheumatology*, **12:** 239-247.

FELDTKELLER, E., KHAN, M., 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. *Rheumatology international*, **23:** 61-66.

GABRIEL, S. E., & MICHAUD, K. (2009). Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther,* **11:** 229.

GALOCHA, B., & DE CASTRO, J. A. L. (2010). Mutational analysis reveals a complex interplay of peptide binding and multiple biological features of HLA-B27. Journal of Biological Chemistry, 285: 39180-39190.

GENECARDS. 2013 [genecards.org]. STAT3. Erişim: [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT3]. Erişim Tarihi:17,05,2013.

GENECARDS. 2013 [genecards.org]. Janus kinase 2. Erişim:[GeneCardshttp://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAK2&search=jak2]. Erişim Tarihi:17,05,2013.

GENSCARDS. 2013 [genecards.org]. TNFRSF1A. Erişim: [http://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=TNFRSF1A&search=TNFRSF1A]. Erişim Trihi 17,05,2013.

GENETICS HOME REFERENCE. 2013. [ghr.nlm.nih.gov]. IL23R. Erişim: [http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL23R]. Erişim Tarihi: 19.05.2013.

GRAN, J. T., & HUSBY, G. (1995). HLA-B27 and spondyloarthropathy: value for early diagnosis?. *Journal of medical genetics,* ***32*****:** 497.

GU, J., RIHL, M., MÄRKER-HERMANN, E., BAETEN, D., KUIPERS, J. G., SONG, Y. W., & YU, D. T. Y. (2002). Clues to pathogenesis of spondyloarthropathy derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles. *The Journal of rheumatology,* **29:** 2159-2164.

HÖHLER, T., SCHÄPER, T., SCHNEIDER, P. M., ZUM BÜSCHENFELDE, K. H. M., & MÄRKER-HERMANN, E. (1998). Association of different tumor necrosis factor α promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis & Rheumatism,* **41:** 1489-1492.

HU, K., HOU, S., JIANG, Z., KIJLSTRA, A., & YANG, P. (2012). JAK2 and STAT3 polymorphisms in a Han Chinese population with Behcet's disease. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53: 538-541.

JAMSHIDI, Y., KYRIAKOU, T., GOOLJAR, S. B., COLLINS, L. J., LANE, C. A., SNIEDER, H., WANG, X., SPECTOR, T. D., O'DELL, S. D. (2007). Common STAT3 variants are not associated with obesity or insulin resistance in female twins. Obesity, **15:** 1634-1639.

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 & Rheumatism*, **58:** 2307-2317.

JANEWAY, C., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J. (1999) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, N.Y: Garland Publishers, Chapter 13.

KABASAKAL, Y. (1999). Ankilozan spondilit. In: *KLİNİK ROMATOLOJİ*. Ed.: Gümüşdüş G, Doğanavşargil. İstanbul: Deniz matbaası, p.:445-53.

KABASAKAL, Y. (2003). Spondilartritler. In: *KLİNİK ROMATOLOJİ* El Kitabı.Ed.: Doğanavşargil E, Gümüşdiş G. İzmir: Güven kitabevi, p.:501-39.

KARAASLAN, Y., DOĞANAVŞARGIL, E. (1996). Klinik Romatoloji. Romatoloji Araştırma ve Eğitim Derneği, Hekimler Yayın Birliği, Medikomat Basım Yayın Sanayi, Roche Firması, Medicographics Ajans ve Matbaası, İstanbul, p.: 180-187.

KARADERI, T., HARVEY, D., FARRAR, C., APPLETON, L. H., STONE, M. A., STURROCK, R. D., ... & POINTON, J. J. (2009). Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case–control study and meta-analysis of published series. *Rheumatology*, **48:** 386-389.

KENNA, T. J., DAVIDSON, S. I., & Thomas, G. P. (2011). The genomics and genetics of ankylosing spondylitis. *Advances in Genomics and Genetics*, 1: 9-25.

KENNA, T., DAVIDSON, S., DUAN, R., STREET, S., THOMAS, R., THOMAS, GP, AND BROWN MA (2012) γδ T cells are the major IL-23R responsive population in ankylosing spondylitis and may play a critical role in disease pathogenesis. *Arthritis & Rheumatism*. **64**: 1420-1429.

KHAN, MA. (1999). Ankilosing spondylitis. In: Primer on rheumatic diseases.Ed: Klippel JH. *Arthritis Foundation*, Atlanta, p.:189-93.

KHAN, M. A. (2002). Update on spondyloarthropathies. *Annals of internal medicine*, **136:** 896-907.

KHAN, MA. (2003). Clinical features of ankylosing spondylitis. In: *3nd Ed Rheumatology vol. 2*, Ed: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Edinburg: Mosby, Elsevier Limited, p.: 1161-81.

KHARE, S. D., HANSEN, J., LUTHRA, H. S., & DAVID, C. S. (1996). HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human

beta2-microglobulin (beta2m) double transgenic mice with disrupted mouse beta2m. *Journal of Clinical Investigation*, **98:** 2746.

KHARE, S. D., LUTHRA, H. S., & DAVID, C. S. (1998). Animal models of human leukocyte antigen B27-linked arthritides. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, *24*(4), 883-894.

KEIDEL, S., CHEN, L., POINTON, J., & WORDSWORTH, P. (2013). ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Current opinion in immunology*, 25(1): 97-102.

LAPPALAINEN, M., HALME, L., TURUNEN, U., SAAVALAINEN, P., EINARSDOTTIR, E., FÄRKKILÄ, M., KONTULA, K., PAAVOLA-SAKKI, P. (2008). Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1* 0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflammatory bowel diseases*, 14: 1118-1124.

LEE, Y. H., & SONG, G. G. (2009). Lack of association of TNF-α promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis: a meta-analysis. Rheumatology, 48(11), 1359-1362.

LIPSKY, PE. (1998). Spondyloarthropathies Etiology and pathogenesis. In: Rheumatology 2nd vol.1, Ed: Klippel JH, Dippe PA, London: Mosby,p.: 6.12,1-8.

LIPSKY, PE, El-GABALAWY, HS. (2003) Reactive arthritis: etiology and pathogenesis. In: *3nd Rheumatology vol. 2,* Ed.:Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH . Edinburg: Mosby, Elsevier Limited, p.:1225-32.

LORIES, R. J., LUYTEN, F. P., & DE VLAM, K. (2009). Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*, **11:** 221.

Lysell, J., Padyukov, L., Kockum, I., Nikamo, P., & Ståhle, M. (2012). Genetic Association with ERAP1 in Psoriasis Is Confined to Disease Onset after Puberty and Not Dependent on HLA-C* 06. *Journal of Investigative Dermatology*.

MAKSYMOWYCH, W.P. (2003). Spondyloartropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. In: *Rheumatology. 3Ed*, Ed: Hochberg M, Silman AJ, SmolenJS, Weinblatt ME, Weisman MH. Philadelphia Elsevier Limited, p.: 1183-92.

MATHUR, A. N., CHANG, H. C., ZISOULIS, D. G., STRITESKY, G. L., YU, Q., O'Malley, J. T., ... & KAPLAN, M. H. (2007). Stat3 and Stat4 direct

development of IL-17-secreting Th cells. *The Journal of Immunology*, **178:** 4901-4907.

MAY, E., DULPHY, N., FRAUENDORF, E., DUCHMANN, R., BOWNESS, P., DE CASTRO, L., , TOUBERT, A., Märker-Hermann, E. (2002), Conserved TCR β chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*, **60:** 299–308.

MIELANTS, H., VEYS, E. M., CUVELIER, C., DE VOS, M., GOEMAERE, S., DE CLERCQ, L.... & ELEWAUT, D. (1995). The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. *The Journal of rheumatology*, **22:** 2273.

MILICIC, A., Lindheimer, F., Laval, S., Rudwaleit, M., Ackerman, H., Wordsworth, P., ... & Brown, M. A. (2000). Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes and immunity*, **1:** 418.

MILNER, J. D., BRENCHLEY, J. M., LAURENCE, A., FREEMAN, A. F., HILL, B. J., ELIAS, K. M., ... & DOUEK, D. C. (2008). Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*, **452:** 773-776.

MITCHELL, R, SH., Kumar, Vinay., Abbas, Abul K., Fausto, N (2007). Robbins Basic Pathology, 8nd. Philadelphia: *Saunders*. P.:1-4160-2973-7.

MCGONAGLE, D., GIBBON, W., & EMERY, P. (1998). Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. *The Lancet*, **352:** 1137-1140.

MURRAY, J., BARBARA, J. A., DUNKLEY, S. A., LOPEZ, A. F., VAN OSTADE, X., CONDLIFFE, A. M., ... & CHILVERS, E. R. (1997). Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-α: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*, **90(7)**: 2772-2783.

NCBI-dbSNP. 2013. [ncbi.nlm.nih.gov]. rs10974944. Erişim: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10974944]. Erişim Tarihi 17,05,2013.

PALADINI, F., TACCARI, E., FIORILLO, M. T., CAULI, A., PASSIU, G., MATHIEU, A., ... & SORRENTINO, R. (2005). Distribution of HLA–B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism*, **52(10):** 3319-3321.

PARK, J. H., ADORO, S., GUINTER, T., ERMAN, B., ALAG, A. S., CATALFAMO, M., ... & SINGER, A. (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell

antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nature immunology*, **11(3):** 257-264.

POINTON, J. J., HARVEY, D., KARADERI, T., APPLETON, L. H., FARRAR, C., STONE, M. A., ... & WORDSWORTH, B. P. (2010). Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes and immunity*, **11(6):** 490-496.

POOLE, A. R. (1998). The histopathology of ankylosing spondylitis: are there unifying hypotheses?. *The American journal of the medical sciences*, **316(4):** 228-233.

RAHMAN, P., INMAN, R. D., GLADMAN, D. D., REEVE, J. P., PEDDLE, L., & MAKSYMOWYCH, W. P. (2008). Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, **58(4):** 1020-1025.

REVEILLE, J. D. (2012). Genetics of spondyloarthritis—beyond the MHC. Nature Reviews Rheumatology, 8: 296-304.

RINGROSE, J. H. (1999). HLA-B27 associated spondyloarthropathy, an autoimmune disease based on crossreactivity between bacteria and HLA-B27?. *Annals of the rheumatic diseases*, **58(10):** 598-610.

RINK, L., & KIRCHNER, H. (1996). Recent progress in the tumor necrosis factor-α field. *International archives of allergy and immunology*, **111(3):** 199-209.

RITCHLIN, C. (2006). Newer therapeutic approaches: spondyloarthritis and uveitis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, **32(1):** 75-90.

ROMERO-SÁNCHEZ, C., LONDOÑO, J., DELGADO, G., JAIMES, D. A., DE AVILA, J., MORA, A., ... & VALLE-OÑATE, R. (2012). Association of tumor necrosis factor alpha-308 promoter polymorphism with spondyloarthritides patients in Colombia. *Rheumatology international*, ***32*(7):** 2195-2197.

RUDWALEIT, M., & HÖHLER, T. (2001). Cytokine gene polymorphisms relevant for the spondyloarthropathies. *Current opinion in rheumatology*, ***13*(4):** 250-254.

RUDWALEIT, M., SIEGERT, S., YIN, Z., EICK, J., THIEL, A., RADBRUCH, A., ... & BRAUN, J. (2001). Low T cell production of TNFα and IFNγ in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Annals of the rheumatic diseases*, **60(1):** 36-42.

RUDWALEIT, M., HAIBEL, H., BARALIAKOS, X., LISTING, J., MÄRKER-HERMANN, E., ZEIDLER, H., & SIEPER, J. (2009). The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis & Rheumatism*, ***60*(3):** 717-727.

RUEDA, B., OROZCO, G., RAYA, E., FERNANDEZ-SUEIRO, J. L., MULERO, J., BLANCO, F. J., ... & MARTIN, J. (2008). The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*, **67(10):** 1451-1454.

SATO, K., SHIOTA, M., FUKUDA, S., IWAMOTO, E., MACHIDA, H., INAMINE, T., & TSUKAMOTO, K. (2009). Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *Journal of clinical immunology*, ***29*(6):** 815-825.

SIVRIOĞLU K. (2005). Ankilozan Spondilitte Sınıflama, Etiyopatogenez ve Değerlendirme. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*; 51(Özel Ek B):B44-50

SUNG, I. H., KIM, T. H., BANG, S. Y., KIM, T. J., LEE, B., PEDDLE, L., ... & INMAN, R. D. (2009). IL-23R polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Korea. *The Journal of Rheumatology*, **36(5):** 1003-1005.

SZABO, S. M., LEVY, A. R., RAO, S. R., KİRBACH, S. E., LACAİLLE, D., CİFALDİ, M., & MAKSYMOWYCH, W. P. (2011). Increased risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases in individuals with ankylosing spondylitis: A population-based study. *Arthritis & Rheumatism*, **63(11):** 3294-3304.

ŞENEL, K., ERDAL, A. (2002). Ankilozan Spondilit. Romatizmal Hastalıkların tanı ve tedavisi. Ed: Göksoy T . İstanbul: Yüce dağıtım, s.: 622-36.

TAM, L. S., GU, J., & YU, D. (2010). Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nature Reviews Rheumatology*, ***6*(7):** 399-405.

TARTAGLIA, L. A., WEBER, R. F., FIGARI, I. S., REYNOLDS, C., PALLADINO, M. A., & GOEDDEL, D. V. (1991). The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88(20):** 9292-9296.

TAUROG, J. D., RICHARDSON, J. A., CROFT, J. T., SIMMONS, W. A., ZHOU, M., FERNÁNDEZ-SUEIRO, J. L., ... & HAMMER, R. E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of experimental medicine*, **180(6):** 2359-2364.

TAUROG, J.D., LIPSKY, P.E. (1998). Ankylosing Spondylitis, *Harrison's Principles of Internal Medicine Volüm:2*, Ed: Fauci, A S., Braunward, E., Isselbacher, K J.,

Wilson, JD., Martin, J B., Kasper, D L., Hauser, S L., Longo, D L., Donnelley, RR, and Sons, 14th edition, p.; 317:1904-1906.

VAN DER LINDEN, S. M., VALKENBURG, H. A., DE JONGH, B. M., & CATS, A. (1984). The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. Arthritis and rheumatism, 27(3): 241-249.

VAN DER LINDEN, S., VAN DER HEIJDE, D., JUERGEN, B (2005). Ankylosing Spondylitis. In: Kelly's textbook of Rheumatology. Vol. II. Ed.: Ruddy S, Harris E, Sledge C, Budd R, Firestein G, Genovese M . 7nd. Philadelphia: Elseiver Saunders, p.: 1125-41.

VAN DER LINDEN, S., VAN DER HEJDE, D., LANDEWE, R. (2008). Calsification and epidemiology of spondyloarthritis. In; Rheumatology, Hochberg, MC., SİLMAN, AJ., WEİNBLATT, M.,WEİSMAN, MH. 4 Ed. Philadelphila Mosby El sevier 2008 p.1103-7.

VERNON-ROBERTS, B. (2003). Ankylosing spondylitis: Pathology. In: Rheumatology vol. II. Ed:Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. 3nd Ed, Edinburg: Mosby, Elsevier Limited, p.:1205-10.

VASSALLI, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology*, **10(1):** 411-452.

WASCHKE, K. A., VILLANI, A. C., VERMEIRE, S., DUFRESNE, L., CHEN, T. C., BITTON, A., COHEN, A., THOMSON, A., WILD, G. E. (2005). Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. *The American journal of gastroenterology*, **100:** 1126-1133.

WTCCC TASC (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*, **39:** 1329–1337.

YAN, J., PAREKH, V. V., MENDEZ-FERNANDEZ, Y., OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D., DRAGOVIC, S., HILL, T., & VAN KAER, L. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *The Journal of experimental medicine*, **203:** 647-659.

YANG, X. O., PANOPOULOS, A. D., NURIEVA, R., CHANG, S. H., WANG, D., WATOWICH, S. S., & DONG, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*, **282:** 9358-9363.

YOUNG, H. A., & BREAM, J. H. (2007). IFN-γ: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. In Interferon: The 50th Anniversary (pp. 97-117). Springer Berlin Heidelberg.

YUAN, Z. L., GUAN, Y. J., WANG, L., WEI, W., KANE, A. B., & CHIN, Y. E. (2004). Central role of the threonine residue within the p+ 1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Molecular and cellular biology,* **24:** 9390-9400.

Zhang Y, Shi S, Ciurli C, Poole AR. (2002). Animal models of ankylosing spondylitis.*Curr Rheumatol Rep,* **4(6):** 507-12.

ZOU, J., APPEL, H., RUDWALEIT, M., THIEL, A., & SIEPER, J. (2005). Analysis of the CD8+ T cell response to the G1 domain of aggrecan in ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases,* **64:** 722-729.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ankilozan spondilit ve inflamatuar barsak hastalığında IL23 gen polimorfizmi, ERAP1 gen polimorfizmi JAK 2, TRADD, TNFR 1 gen polimorfizminin spondiloartropati gelişmesindeki rollerinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Nuran TÜRKÇAPAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Romatoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Romatoloji Bilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Prospektif Takip Çalışması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR
24 Nisan 2013

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

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:42-900	Tarih: 26 Aralık 2011
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş, gönüllü seçiminde "hastaların romatolojik hastalıkları bulunmadığını gösteren" bilginin "hariç tutm kriterleri"ne eklenmesi koşuluyla, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimse sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Hakan UNCU	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLİ
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Öğr.Gör.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	ŞEHİ İŞİNİ

* :Toplantıda Bulunma

24 Nisan 2013

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı	Saeid
Soyadı	ASSADPOUR
Dogum yeri ve tarihi	Tabriz, 15/09/1985
Uyrugu	İranlı
Medeni durumu	Bekar
İletisim adresi ve telefonu	Ankara Üniversitesi Öğrenci Evi, Fatih Caddesi, Gazino Durağı Keçiören. Cep: 535 433 12 38

II- Egitimi

2001-2005	Şahed Okulu, Tabriz
2006-2010	Labratoar bilimleri, Tabriz Devlet Üniversitesi
2011-2013	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi- İç Hastalıkları ABD Diagnostik İmmünoloji Tezli Yüksek Lisans
Yabancı dili	İngilizce
III- Ünvanları	Biolog

VII- Bilimsel Etkinlikleri

10-12 Mayıs 2012	Türk İmmünoloji Derneği Bölgesel Sempozyomları-Kahramanmaraş
27-30 Nisan 2013	Transplantasyon İmmünolojisi Kursu
27-30 Nisan 2013	4.Ulusal Transplantasyon İmmünoloji ve Genetiği Kongresi ve Deutsch-Türkisches İmmungenetik symosium