

# Ankilozan spondilit ile *HLA-B27*, *MEFV* gen mutasyonları, *ERAP1*, *IL12B* ve *IL23R* gen polimorfizmleri arasındaki ilişki

[Association of *HLA-B27*, *MEFV* gene mutations, *ERAP1*,  
*IL12B* and *IL23R* gene polymorphisms with ankylosing spondylitis]

Filiz Sarıkaya Pekacar<sup>1</sup>,  
Ali Akdoğan<sup>2</sup>,  
Mutlu Hayran<sup>3</sup>,  
Reyhan Çolak<sup>1</sup>,  
Engin Yılmaz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü, Ankara;  
<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bölümü  
Ankara;  
<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Preventif Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara;  
<sup>4</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Yazışma Adresi  
[Correspondence Address]

Engin Yılmaz

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji  
Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye  
Telefon: +90 312 3052541  
E-posta: eyilmaz@hacettepe.edu.tr

Kayıt Tarihi: 12 Haziran 2014; Kabul Tarihi: 21 Temmuz 2014  
[Registered: 12 June 2014; Accepted: 21 July 2014]

## ÖZET

**Amaç:** Ankilozan spondilitin patogenezinde genetik faktörler önemli bir role sahiptir. Bu çalışmanın amacı, *HLA-B27*, *MEFV* gen mutasyonları, *IL12B*, *IL23R* ve *ERAP1* gen polimorfizmleri ile Türk AS hastaları arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

**Metod:** Yüz AS hastası ve 100 sağlıklı kontrolde, *HLA-B27*, sık görülen 12 *MEFV* gen mutasyonu, *IL12B* (rs3213120), *IL23R* (rs11209026) ve *ERAP1* (rs30187) gen polimorfizmleri allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), revers hibridizasyon ve DNA dizi analiz teknikleri ile analiz edildi. Hastalığın aktivitesi BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) ve BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) skorlaması ile analiz edildi.

**Bulgular:** Bu çalışma *HLA-B27* ile AS arasındaki kuvvetli ilişkiyi bir kere daha doğrulamıştır ( $p < 0.001$ , OR:29.6, %95 CI:12.3-71.1). Hastalığın üveit bulgusu ile *HLA-B27* pozitif olan AS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p=0.004$ ). *MEFV* mutasyon sıklığının AS hastalarında (%40) kontrole (%22) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $p=0.006$ , OR:2.5, %95 CI:1.3-4.4). *ERAP1* genindeki rs30187 polimorfizmi ile AS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ( $p=0.033$ ). AS hastalarında, rs30187-CT genotipinin, CC ve TT genotiplerine göre daha sık görüldüğü belirlenmiştir (OR:2.1, %95 CI:1.2-3.7). Bununla beraber C allelini taşıyan AS hastalarında risk 1.9 kat artmaktadır (%95 CI:1.06-3.3). AS ile *IL12B* (rs3213120) ve *IL23R* (rs11209026) polimorfizmleri arasında bir ilişkinin olmadığı belirlendi. *HLA-B27*, *MEFV* mutasyonları ve *ERAP1*-rs30187 polimorfizminin hastalığın BASDAI (Bath AS Disease Activity Index) ve BASFI (Bath AS Functional Index) skorlarına etkisi olmadığı belirlendi.

**Sonuç:** Bu çalışmada, *HLA-B27*, *MEFV* mutasyonları ve *ERAP1* (rs30187) polimorfizminin AS için genetik yatkınlık genleri olabileceğine dair ön bulgular elde edilmiştir. *HLA-B27*, *MEFV* mutasyonları ve *ERAP1* polimorfizmi arasındaki ilişki AS patogenezinde önemli bir rol oynayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Ankilozan spondilit, *HLA-B27*, *MEFV*, *ERAP1*, *IL12B* ve *IL23R*.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların çıkar çatışması yoktur.

## ABSTRACT

**Objective:** Genetic factors have an important role in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (AS). The aim of this study was to analyse the association of *HLA-B27*, *MEFV* mutations, *IL12B*, *IL23R* and *ERAP1* polymorphisms in Turkish patients with ankylosing spondylitis.

**Methods:** One hundred AS patients and 100 healthy controls were examined for *HLA-B27*, 12 common *MEFV* mutations, *IL12B* (rs3213120), *IL23R* (rs11209026), and *ERAP1* (rs30187) polymorphisms (SNPs) by allele specific PCR, revers hybridization and sequencing techniques. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) scores were calculated.

**Results:** Our results confirmed that *HLA-B27* was strongly associated with AS (69% vs 7% in controls) ( $p < 0.001$ , OR: 29.6, 95% CI: 12.3-71.1). We also found an association between uveitis and *HLA-B27* positivity in AS patients ( $p=0.004$ ). The *MEFV* mutations were significantly frequent in AS patients (40%) compared with healthy controls (22%) ( $p=0.006$ , OR: 2.56, 95% CI: 1.3-4.4). We found that *ERAP1* rs30187 was significantly associated with AS patients ( $p=0.033$ ). The rs30187 CT genotype was associated with increased AS risk compared to CC or TT genotypes (OR: 2.1, 95% CI: 1.2-3.7). However, in patients with AS carrying the C allele increased the risk 1.9 times (95% CI: 1.1-3.3). There was no association with AS and *IL12B* (rs3213120) and *IL23R* (rs11209026). There were no significant differences between *HLA-B27*, *MEFV* mutations, *ERAP1* (rs30187) and Bath AS Disease Activity Index (BASDAI), Bath AS Functional Index (BASFI) scores.

**Conclusion:** This study showed that *HLA-B27*, *MEFV* mutations and *ERAP1* (rs30187) are AS genetic susceptibility genes. Interactions between *ERAP1* and *HLA-B27* and *MEFV* mutations may play an important role in the AS pathogenesis.

**Key Words:** Ankylosing spondylitis, *HLA-B27*, *MEFV*, *ERAP1*, *IL12B* and *IL23R*.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Giriş

Ankilozan spondilit (AS), kronik, inflamatuvar artrite yol açan, omurga ve sakroiliak eklemlerde ağrıya ve tutulmalara neden olan otoimmün bir hastalıktır. Kalça ve periferik eklem artriti yaygın olup, ayrıca, uvea bölgesi, tendon bağlantı noktası, proksimal aorta gibi ekstra artiküler bölgeleri, nadiren akciğer ve böbrekleri de etkilemektedir [1]. Hastalığın belirtileri ve prevalansı, cinsiyete, yaşa ve ırka göre değişkenlik göstermektedir. Prevalansı Avrupa'da 10.000'de 23.8, Asya'da 16.7, Kuzey Amerika'da 31.9 ve Afrika'da 7.4 olarak bildirilmiştir [2]. AS'te başlangıç yaşı genellikle 20'li ve 30'lu yaşlardır; erkeklerde görülme sıklığı kadınlarda görülme sıklığına göre daha yüksektir. Bu oran erkeklerde %0.54 iken kadınlarda %0.44'tür [3]. Patogenezinde çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı bilinmektedir. AS'ye yatkınlık çoğunlukla genetik faktörler ve çevresel etkenlerden kaynaklanmaktadır [4]. AS ile *MHC* Sınıf I (Major Histocompatibility Complex) üyesi olan HLA-B27 arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır [5]. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, farklı popülasyonlarda, farklı dağılımlar gösteren en az 100 HLA-B27 alt tipi saptanmıştır [6,7]. Peptid bağlama bölgesinde yer alan birkaç amino asitteki farklılık, farklı HLA-B27 alt tiplerinin oluşmasına neden olmaktadır. B\*2705 daha çok beyaz ırkta, B\*2704 ise, daha çok Güney Doğu Asya'da görülmektedir [8]. Genel popülasyonun %5'i HLA-B27 için pozitif iken, HLA-B27 pozitif kişilerin sadece %1-5'inde AS hastalığı görülmektedir [5]. Ülkemizde ise, AS'li hastalarda HLA-B27'nin pozitif olma oranı %70'tir [9,10]. Ankilozan spondilitli hastalarla yapılan aile çalışmaları sınırlı olsa da birinci dereceden akrabası AS olan olgularda, genel popülasyondaki HLA-B27 pozitif olan bireylere göre hastalığa yakalanma riskinin 5-16 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir [11]. İkiz çalışmalarında ise, tek yumurta ikizlerinde konkordans oranı %25-64, çift yumurta ikizlerinde konkordans oranı %4-12.5'tir [11]. Bu farklılık, hastalığın patogenezinde HLA-B27'nin tek başına rol oynamadığını göstermektedir. AS'ye neden olan genlerin tanımlanabilmesi için yapılan bağlantı analizlerinde ve genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarında, hastalıkla ilişkili birçok kromozom bölgesi belirlenmiştir. Avrupa'dan yapılan çalışmalarda, *ERAPI* (5q15: Endoplasmic reticulum aminopeptidaz1), *KIF21B* (1q32: Kinesin family member 21B), *IL23R* (1q31: IL23 receptor), *RUNX3* (1p36: Runt-related transcription factor 3), *IL12B* (5q33: IL12B gene) ve *LTBR-TNFRSF1A* (12p13: TNF receptor) gen bölgelerindeki tek nükleotid değişiklikleri (SNP) ile AS hastalığı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [12]. Çin'den yapılan iki GWAS çalışmasının birincisinde, *HAPLN1-EDIL3* (5q14.3: HAPLN1: Proteoglican link protein1, EDIL3: EGF-like repeats and discodin I-like domain 3), *ANO6* (12q12: Anoctamin 6) [13], diğer çalışmada ise, *ANTXR2* (Anthrax toxin receptor 2: 4q21) ve *IL23R* (1p31) genlerindeki bazı SNP'lerin AS hastalığı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [14]. Aynı zamanda bu çalışma-

larda *MHC* lokusunun (6q21) hastalıkla en fazla ilişkili bölge olduğu da gösterilmiştir [15].

AS, ailesel Akdeniz ateşi (AAA) hastalığına sebep olan *MEFV* (*ME*diterranean *Fe*Ver) gen mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir. AS hastalarında *MEFV* mutasyonlarının sıklığı, sağlıklı bireylere oranla daha fazla gözlenmektedir [16]. AAA çoğunlukla Türk, Yahudi, Ermeni ve Orta Doğu Arap popülasyonunda görülen otoinflamatuvar bir hastalık olup, serozit, peritonit ve ataklar şeklinde tekrarlayan ateşle karakterize edilmektedir [17]. Otozomal resesif kalıtılan AAA'nın ülkemizdeki prevalansı 1/1075'tir [18]. p.M694V, p.M680I, p.V726A ve p.E148Q mutasyonları Türk AAA hastalarında en sık görülen *MEFV* mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların sıklıkları ise sırasıyla %51.40, %14.40, %8.60 ve %3.50 [19]. AS hastalarında *MEFV* mutasyonlarının sıklığı ile ilgili Türkiye'de farklı merkezlerden yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, *MEFV* mutasyonları taşıyan AS hastalarının yüzdesi %22-39 arasında değişiklik göstermektedir. AS hastalarında da en yaygın *MEFV* mutasyonu p.M694V (ortalama %12) olarak belirtilmiştir [16,20,21]. AS kohortlarında yapılmış olan ilişkilendirme çalışmaları değerlendirildiğinde *IL12B* [22], *IL23R* [23] ve *ERAPI* [24] genlerindeki SNP'lerin allel sıklığının, sağlıklı popülasyona göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Bu çalışma iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümünde AS'li hastalar ve kontrol grubunda HLA-B27 pozitif/negatifliği ile *MEFV* mutasyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise, AS kohortlarının GWAS çalışma sonuçlarından seçilmiş *IL12B*, *IL23R* ve *ERAPI* genlerindeki rs3213120, rs11209026 ve rs30187 SNP'leri, AS hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda çalışılarak, AS hastalığının bu gen bölgeleri ile olası ilişkisi analiz edilmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### *DNA örneklerinin hazırlanması*

Çalışmamızda 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Anabilim Dalına başvuran Ankilozan spondilitli 100 hasta (60 erkek, ortalama yaş 38.75 ve 40 kadın, ortalama yaş 38.42) ve 100 sağlıklı popülasyona ait DNA örnekleri kullanıldı. Hastaların demografik ve klinik bulguları Tablo 1'de verilmiştir. Örneklerin miktarları ve saflıkları, Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı ile ölçülerek 100 ng/μl'lik çalışma dilüsyonları hazırlandı. Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırma Etik Kurulu'nun onayı alınarak (HEK-05/95-35) gerçekleştirilmiştir.

### *MEFV mutasyonlarının analizi*

Ankilozan spondilitli hastalarda ve kontrol örneklerinde *MEFV* mutasyonları revers-hibridizasyon prensibine dayanan *FMF strip assay* (ViennaLab) ile tespit edildi.

**Tablo 1.** Ankilozan spondilitli hastaların demografik ve klinik özellikleri

Kadın/Erkek	40/60
Yaş	38.5±10.9
Hastalık süresi (yıl)	13.5±9.3
Hastalık başlangıç yaşı	25.3±7.8
Periferik eklem tutulumu	%44.0
Kalça eklemi tutulumu	%28.0
Total kalça protezi	%3.0
Üveit	%14.0
Hemoglobin (g/dl)	13.7±1.7
Sedimentasyon hızı (mm/saat)	18.4±17.3
CRP (mg/dl)	1.7±2.2
24 saatlik idrar protein atılımı (mg)	113.9±85.5
BASDAI	4.0±2.2
BASFI	2.8±2.3

CRP: C-reaktif protein; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index.

Biyotin işaretli primerler kullanılarak *MEFV* geninin 2, 3, 5 ve 10. ekzon bölgeleri eş zamanlı olarak (multipleks amplifikasyon) çoğaltıldı. Amplikonlar, membran üzerine immobilize edilmiş 12 *MEFV* mutasyonuna özgül oligonükleotid prob hibridizasyonu ile analiz edildi.

#### **HLA-B27 allel sıklığının analizi**

Ankilozan spondilitli hastalarda ve kontrol örneklerinde HLA-B27 allel sıklığı, allele özgü amplifikasyon tekniği ile tespit edildi. Bu çalışmada internal kontrol olarak büyüme faktör (*BF*) gen bölgesi kullanıldı.

#### **IL12B, ERAP1 ve IL23R gen bölgelerindeki SNP'lerin analizi**

*IL12B* gen bölgesindeki rs3213120 ve *ERAP1* gen bölgesindeki rs30187 polimorfizmlerinin bulunduğu bölgeler,

allele özgü amplifikasyon primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Amplikonlar, *Hinf I* ve *Dde I* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak analiz edildi. *IL23R* gen bölgesindeki rs11209026 polimorfizminin analizinde DNA dizileme metodu kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan primer dizileri, Tm dereceleri, amplikon büyüklükleri, *Hinf I* ve *Dde I* restriksiyon endonükleaz fragment büyüklükleri Tablo 2’de verilmiştir.

#### **İstatistiksel analizler**

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Genotip ve allel sıklıkları arasındaki farklar Ki-kare test veya Fisher’s testi ile karşılaştırıldı. Tahmini rölatif risk oranları (ORs 95% CIs) hesaplandı ve 0.05’in altındaki *p* değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## **Bulgular ve Sonuçlar**

#### ***MEFV* mutasyonlarının sıklığı**

Ankilozan spondilitli hastaların %40’ının *MEFV* mutasyonu taşıdığı tespit edildi ( $p=0.006$ , OR:2.5, %95 CI:1.3-4.4). Bu hastaların 33 tanesinin (%82.5) tek allelinde, 7 tanesinin ise (%17.5) her iki allelinde *MEFV* mutasyonu taşıdığı saptandı. p.M694V (%7.5) ve p.E148Q (%6.0) en sık görülen *MEFV* mutasyonları olarak belirlendi. *MEFV* mutasyonlarının allel sıklıkları Tablo 3’de verilmiştir. Ankilozan spondilitli hasta grubunda ve sağlıklı bireylerde p.E148Q mutasyonu aynı oranda saptanmıştır. p.E148Q minör bir mutasyon olup sağlıklı Türk popülasyonunda da aynı sıklıkta bulunmaktadır [25]. AS’li hastalar, *MEFV* mutasyonları açısından genotipik olarak değerlendirildiğinde, 7 AS hastasının her iki allelinde de *MEFV* mutasyonu taşıdıklarının belirlenmesi, (Tablo 5) bu hastaların hem ailevi Akdeniz ateşi hem de AS olarak değerlendirilmesi gerektirdiğini göstermektedir. *MEFV* mutasyonlarının, hastalığın klinik bulgularından kalça tutulumu, peri-

**Tablo 2.** Primer dizileri, Tm dereceleri, amplikon büyüklükleri ve analiz yöntemleri

	Primer Dizileri (forward/reverse)	Tm Derecesi	Amplikon (bç)	Analiz yöntemi
HLAB27	F: 5’CAG TCT GTG CCT TGG CGT TGC3’ R: 5’GCT ACG TGG ACG ACA CGT3’	59	144	%3 Agaroz jel
BF	F: 5’GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA3’ R: 5’TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT3’	59	429	
IL12B rs3213120	F: 5’CAC ATC AAC TTT TGG CAT TCT CTT CC C3’ R: 5’GCA ACT TGA GAG CTG GAA AAT CTA TAC3’	55	251	Hinf I G Allel:251bç A Allel:223+28 bç
ERAP1 rs30187	F: 5 TGA AAA CCA TGA TGA ACA CTT GGA CAC TGCTGA3’ R: 5’TGA TTT CAA GCC AGT AAC CAG3’	55	423	Dde I C Allel:423 bç T Allel:390+33 bç
IL23R rs11209026	F: 5’TTC TTT GAT TGG GAT ATT TAA CAG ATC ATT TC3’ R: 5’TTG TGG CAG GGT CAT TTT GAG3’	55	249	DNA dizi analizi

ferik eklem tutulumu, üveit ve BASTAI skoruna anlamlı olabilecek bir katkısı olmadığı saptanmıştır.

### HLA-B27 allel sıklığı

Ankilozan spondilitli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda HLA-B27 ilişkisi allele özgül amplifikasyon ile analiz edildi. 69 AS'li hastanın HLA-B27 pozitif, 31 AS'li hastanın ise, HLA-B27 negatif olduğu tespit edildi. Sağlıklı kontrol grubunda ise, 7 kişinin HLA-B27 pozitif, 93 kişinin HLA-B27 negatif olduğu tespit edildi ( $p < 0.001$ , OR:29.6, %95 CI:12.3-71.1). HLA-B27 ile üveit hariç diğer klinik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. HLA-B27 pozitif olan 96 AS hastasının 14'ünde üveit bulguları varken HLA-B27 negatif olan hastalarda üveit bulgusuna rastlanmamıştır. HLA-B27 ile üveit arasında anlamlı olabilecek bir bulgu saptanmıştır ( $p = 0.004$ , Ki-kare test).

*MEFV* mutasyonu taşıyan 40 AS hastasının 26 tanesi HLA-B27 pozitif (%65) ve 14 tanesi de HLA-B27 negatif (%35) olarak belirlenmiştir (Tablo 4).

**Tablo 3.** Ankilozan spondilitli hastalarda ve kontrol grubunda *MEFV* mutasyon sıklığı  $p = 0.006$  (n=200 allel)

Mutasyon	Hasta grubu		Kontrol grubu	
	Allel sayısı	%	Allel sayısı	%
p.M694V	15/200	7.50	3/200	1.50
p.E148Q	12/200	6.00	12/200	6.00
p.P369S	8/200	4.00	0/200	0.00
p.V726A	6/200	3.00	2/200	1.00
p.A744S	5/200	2.50	0/200	0.00
p.K695R	1/200	0.50	0/200	0.00
p.M680I	0/200	0.00	5/200	2.50

**Tablo 4.** Ankilozan spondilitli hastalarında *MEFV* genotip dağılımı ve *MEFV* mutasyonu pozitif olan hastalarda HLA-B27 pozitifliği

MEFV Genotipi	Hasta Sayısı n=40	HLA-B27 Pozitif n=26	HLA-B27 Negatif n=14
p.M694V/p.M694V	1	0	1
p.M694V/p.V726A	1	0	1
p.M694V/p.P369S	1	0	1
p.M694V/p.E148Q	2	2	0
p.P369S/p.E148Q	2	2	0
p.M694V/Normal	9	6	3
p.V726A/Normal	5	4	1
p.E148Q/Normal	8	4	4
p.A744S/Normal	5	4	1
p.P369S/Normal	5	3	2
p.K695R/Normal	1	1	0

**Tablo 5.** Ankilozan spondilitli hastalar ve kontrol grubunda rs3213120 (A>G,  $p = 1.0$ ), rs30187 (C>T,  $p = 0.033$ ) ve rs11209026 (A>G,  $p = 0.55$ ) allel sıklıkları

	AS hasta grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=100)
IL12B:rs3213120		
AA	96 (%96)	96 (%96)
GG	4 (%4)	3 (%3)
AG	0	1 (%1)
Allel yüzdesi		
A	192 (%96)	193 (%96.5)
G	8 (%4)	7 (%3.5)
ERAP1:rs30187		
CC	15 (%15)	18 (%18)
TT	33 (%33)	48 (%48)
CT	52 (%52)	34 (%34)
Allel yüzdesi		
C	82 (%41)	70 (%35)
T	118 (%59)	130 (%65)
IL23R:rs11209026		
AA	0	0
GG	93 (%93)	95 (%95)
AG	7 (%7)	5 (%5)
Allel yüzdesi		
A	7 (%3.5)	5 (%2.5)
G	193 (%96.5)	195 (%97.5)

### IL12B, IL23R ve ERAP1 gen bölgelerindeki SNP'lerin sıklıkları

Ankilozan spondilitli hastalar ve kontrol grubu arasında, *IL12B* gen bölgesindeki rs3213120 ve *IL23R* gen bölgesindeki rs11209026 polimorfizmleri açısından bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 5). *ERAP1* gen bölgesindeki rs30187 polimorfizminde ise, heterozigot (CT allel) allellerin sıklığı Ankilozan spondilitli hastalarda (%52), kontrol grubuna (%34) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p = 0.033$ , OR:2.1, %95 CI:1.2-3.7). Bununla beraber C allelini taşıyan AS hastalarında risk 1.9 kat artmaktadır (%95 CI:1.06-3.3) (Tablo 5). CT allellerini taşıyan 52 kişiden 36'sı HLA-B27 pozitif (%69.23), 16 kişi ise (%30.76) HLA-B27 negatif olarak belirlenmiştir. CT allellerini taşıyan ve HLA-B27 pozitif olan 36 kişinin yalnızca 13 tanesi *MEFV* mutasyonu taşımaktadır (5 kişi p.P369S, 4 kişi p.E148Q, 2 kişi p.V726A, p.M694V ve p.K695R birer kişi). *ERAP1* gen bölgesindeki rs30187 polimorfizminin CT genotipi ile AS'li hastaların klinik bulguları arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, CT genotipini taşıyan AS'li hastalarda BASTAI skoru, CT genotipini taşımayanlara göre anlamlı bulunmuştur ( $p = 0.029$ ).

### Tartışma

Bu çalışmada, HLA-B27, *MEFV* gen mutasyonları ve ark.



*ERAP1* genindeki rs30187 polimorfizminin Ankilozan spondilitli hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisinin olduğu gösterildi.

Uzun yıllar önce HLA-B27'nin, AS gelişimi için en önemli genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Son çalışmalar AS gelişiminde *MHC* dışındaki genetik faktörlerin de önemli olduğunu göstermektedir. İkiz çalışmaları AS kalıtımının %90 genetik olduğunu ve kalıtım modelinin birçok genin işin içine karıştığı oligogenik bir kalıtım olabileceğini düşündürmektedir.

HLA-B27'nin Avrupalı sağlıklı bireylerdeki sıklığı %8, Han Çinlilerinde ise %3-5 olarak rapor edilmiştir [26]. Türkiye'den yapılan çalışmalarda ise, sağlıklı Türk populasyonunda HLA-B27 sıklığı %5-8 olarak bildirilmiştir [27]. Bu çalışmada da sağlıklı kontrol grubunda HLA-B27 sıklığı %7 olarak belirlenmiştir. Avrupa ve Türkiye'den yapılan birçok çalışmada AS hastalarında HLA-B27 sıklığı %70-90 arasında rapor edilmiştir [5,28]. Bu çalışmada da biz AS hastalarındaki HLA-B27 sıklığını (%69) benzer oranda bularak daha önce rapor edilen sonuçları bir kez daha desteklemiş olduk.

HLA-B27'nin AS gelişimindeki rolü henüz tam olarak bilinmemekle beraber, AS gelişiminde iki farklı mekanizma ile rol oynadığı düşünülmektedir. Birincisi HLA-B27-peptid kompleksleri (Arthritogenic peptide hypothesis) hipotezidir [29]. Bazı bakteriyel peptidler HLA-B27 peptid komplekslerine çok benzemektedirler, bu nedenle bazen T lenfositleri aktive ederek otoreaktiviteye ve otoimmün hastalıklara neden olabilmektedirler. Diğer bir teori ise, homodimer yapılar ve paketlenemeyen HLA-B27 proteinleri, endoplazmik retikulum (ER) içinde birikerek bir ER stresi oluşturmakta ve bu stres IL-23 salınımını tetikleyerek, IL-17 yoluyla yine T lenfositlerin aktivasyonuna neden olmaktadır [30]. Bu hipotezler üzerinde uzun yıllar çalışılmasına rağmen AS gelişiminde HLA-B27'nin işlevi hala açıklanamamıştır.

Son çalışmalar, Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) hastalığına neden olan *MEFV* mutasyonlarının da, Behçet, romatoid artrit, *Crohn's* hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıkların seyri üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir [31,32].

Bu çalışmada, *MEFV* mutasyon sıklığı AS hastalarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. AS hastalarında p.M694V (%7.5) ve p.E148Q (%6) mutasyonları diğer mutasyonlara göre daha sık görülmektedir. p.M694V mutasyonu AAA hastalarında en sık görülen mutasyonu olmasının yanı sıra hastalığın şiddeti ve AA amiloid gelişimi ile de ilişkilendirilmiştir. p.E148Q mutasyonu düşük penetransa sahip olup, AAA hastalığın şiddetine bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Bu mutasyonun sıklığının AAA hastalarında %3.5, AS hastalarında %6 ve sağlıklı çalışma grubunda da %6 oranında saptanması bunun bir göstergesidir.

Son yıllarda Avrupa ve Çin'den yapılan GWAS çalışmalarında romatoid artrit (RA), psoriatrik artrit (PsA) ve AS için birçok aday gen ve kromozom lokusu belirlenmiştir. Bunlar içinden öne çıkan *IL12B*, *IL23R* ve *ERAP1* genleri öncelikli çalışmaları oluşturmaktadır.

*IL12* ve *IL23* genleri doğal ve kazanılmış immün sistem arasındaki köprüde kritik bir öneme sahiptirler. Bu genler IL-17 üreten ve doğal Th17 hücrelerine farklılaşabilen doğal CD4+T hücrelerini uyaran bir dizi olaya aracılık etmektedirler. IL-17 bir pro-inflamatuvar sitokindir ve IL-1, IL-6, TNF-alfa ve nitrik oksit sentetaz üreten T hücrelerinin aktifleşmesini sağlar. *IL23R* ve *IL12B knockout* olan fareler ile yapılan çalışmalarda *IL23R knockout* olan farelerin, IL-17 üreten CD4+T hücrelerin azlığından dolayı artirite daha az yatkın olduğu gözlenmiştir. *IL12B knockout* olan farelerde ise, CD4+ T hücreleri paradoksal olarak daha çok IL-17 ürettikleri için artirite daha çok yatkın olarak gözlenmişlerdir [33]. Son yıllarda *IL23R* ve *IL12B* genlerindeki SNP'ler ile yapılan çalışmalarda, bu genlerin daha çok PsA ile ilişkili olduğunu göstermiştir [34]. Bu çalışmada *IL12B* genindeki rs3213120 ve *IL23R* genindeki rs11209026 SNP'lerinin AS ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisinin olmaması literatürdeki bulguları desteklemektedir.

*ERAP1* proteini antijen sunma görevine sahip metallopeptidaz ailesine ait bir çinko aminopeptidazdır. Bu protein hücrede, MHC Sınıf I molekülleri tarafından sunum için peptid öncüllerinin uygun uzunlukta kırılması ve pro-inflamatuvar sitokinler için hücre yüzey reseptörlerinin düzenlenmesi gibi iki önemli işleve sahiptir [35]. Daha önceki çalışmalarda *ERAP1* genindeki 5 SNP'nin AS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu SNP'lerin *ERAP1* proteininin katalitik aktivitesi, substratın tanınması ve bağlanması, ilgili peptidlerin kırılması gibi işlevlerini etkiledikleri bilinmektedir. rs30187, *ERAP1* proteininin substrat bağlama bölgesinde bulunmakta ve aminopeptidaz aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır [36]. Türkiye'den 150 AS hastası ile yapılan bir çalışmada, bu polimorfizm ile AS hastaları arasında istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır [37]. Bu çalışmada ise, rs30187 CT genotipi ile AS hastaları arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu, ayrıca bu genotipin hastalığın aktivitesine de (BASTAI skoru) etkisinin olduğu saptanmıştır.

Türk AS hastaları ile yapılan çalışmalar, hastalığın moleküler patofizyolojisini açıklamak için, HLA-B27'nin tek başına yeterli olmadığı *MEFV* veya *ERAP1* gibi diğer *MHC* dışı genlerin de hastalığın gelişiminde etkili olabileceğinin ilk bulgularını vermektedir. Çalışma gruplarının 1000-2000 örneğe kadar artırılması daha somut bulguların edinilmesine olanak sağlayacaktır.

#### **Teşekkür**

AS hastalarına ve kontrol grubuna çalışmaya katıldıkları için teşekkür ederiz. Bu çalışmada istatistiksel analizler için kısmi TÜBA desteği kullanılmıştır.

## Çıkar çatışması

Yazarların çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

- [1] Bond D. Ankylosing spondylitis: diagnosis and management. *Nurs Stand* 2013; 28(16-18):52-60.
- [2] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53(4):650-7.
- [3] Onen F, Akar S, Birlik M, Sari I, Khan MA, et al. Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey. *J Rheumatol* 2008; 35(2):305-9.
- [4] Reveille JD. Recent studies on the genetic basis of ankylosing spondylitis. *Curr Rheumatol Rep* 2009; 11(5):340-8.
- [5] Yang T, Duan Z, Wu S, Liu S, Zeng Z, et al. Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. *Mod Rheumatol* 2014; 24(1):150-61.
- [6] Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Schmieder P. Structural and dynamic features of HLA-B27 subtypes. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(4):411-8.
- [7] Khan MA. Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15(10):362.
- [8] Qi J, Li Q, Lin Z, Liao Z, Wei Q, et al. Higher risk of uveitis and dactylitis and older age of onset among ankylosing spondylitis patients with HLA-B\*2705 than patients with HLA-B\*2704 in the Chinese population. *Tissue Antigens* 2013; 82(6):380-6.
- [9] Acar M, Cora T, Tunc R, Acar H. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls. *Rheumatol Int* 2012; 32(10):3103-5.
- [10] Gunal EK, Sarvan FO, Kamali S, Gul A, Inanc M, et al. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine* 2008; 75(3):299-302.
- [11] Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(11):883-6.
- [12] Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet* 2010; 42(2):123-7.
- [13] Lin Z, Bei JX, Shen M, Li Q, Liao Z, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat Genet* 2011; 44(1):73-7.
- [14] Guo C, Xia Y, Yang Q, Qiu R, Zhao H, et al. Association of the ANTXR2 gene polymorphism and ankylosing spondylitis in Chinese Han. *Scand J Rheumatol* 2012; 41(1):29-32.
- [15] International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* 2013; 45(7):730-8.
- [16] Cosan F, Ustek D, Oku B, Duymaz-Tozki J, Cakiris A, et al. Association of familial Mediterranean fever-related MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(11):3232-6.
- [17] Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever--a review. *Genet Med* 2011; 13(6):487-98.
- [18] Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, et al. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol* 1998; 25(12):2445-9.
- [19] Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, et al. Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84(1):1-11.
- [20] Durmus D, Alayli G, Cengiz K, Yigit S, Canturk F, et al. Clinical significance of MEFV mutations in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2009; 76(3):260-4.
- [21] Maraş Y, Akdoğan A, Kısacık B, Kılıç L, Yılmaz E, et al. MEFV mutation frequency and effect on disease severity in ankylosing spondylitis. *Turkish J. Medical Sciences* 2014; 44:203-7.
- [22] Wong RH, Wei JC, Huang CH, Lee HS, Chiou SY, et al. Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2012; 39(1):135-40.
- [23] Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-23R polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2012; 61(2):143-9.
- [24] Keidel S, Chen L, Pointon J, Wordsworth P. ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(1):97-102.
- [25] Yılmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(7):553-5.
- [26] Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7(4):263-9.
- [27] Acar M, Cora T, Tunc R, Acar H. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls. *Rheumatol Int* 2012; 32(10):3103-5.
- [28] Birinci A, Bilgici A, Kuru O, Durupinar B. HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2006; 26(4):285-7.
- [29] Sorrentino R, Böckmann RA, Fiorillo MT. HLA-B27 and antigen presentation: at the crossroads between immune defense and autoimmunity. *Mol Immunol* 2014; 57(1):22-7.
- [30] Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 2014; 57(1):44-51.
- [31] Touitou I, Magne X, Molinari N, Navarro A, Quéllec AL, et al. MEFV mutations in Behçet's disease. *Hum Mutat* 2000; 16(3):271-2.
- [32] Fidler H, Chowers Y, Ackerman Z, Pollak RD, Crusius JB, et al. The familial Mediterranean fever (MEFV) gene as a modifier of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(2):338-43.
- [33] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198(12):1951-7.
- [34] Jadon D, Tillett W, Wallis D, Cavill C, Bowes J, et al. Exploring ankylosing spondylitis-associated ERAP1, IL23R and IL12B gene polymorphisms in subphenotypes of psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(2):261-6.
- [35] Kadi A, Izac B, Said-Nahal R, Leboime A, Van Praet L, et al. Investigating the genetic association between ERAP1 and spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(4):608-13.
- [36] Chen B, Li D, Xu W. Association of ankylosing spondylitis with HLA-B27 and ERAP1: pathogenic role of antigenic peptide. *Med Hypotheses* 2013; 80(1):36-8.
- [37] Cinar M, Akar H, Yılmaz S, Simsek I, Karkucak M, et al. A polymorphism in ERAP1 is associated with susceptibility to ankylosing spondylitis in a Turkish population. *Rheumatol Int* 2013; 33(11):2851-8.