

SEBAHAT AKGÜL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**IGA NEFROPATİSİNDE COSMC GEN DNA METİLASYON
PROFİLİ VE EKSPRESYON DÜZEYİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SEBAHAT AKGÜL

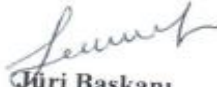
**DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA SAVRAN OĞUZ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü .İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora öğrencisi Sebahat AKGÜL tarafından Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ 'un danışmanlığında hazırlanan "IgA Nefropatisinde COSMC Geni DNA Metilasyon Profili ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından .06/.07./2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof Dr. Filiz AYDIN
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Yaşar ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Nefroloji Anabilim Dalı




Jüri
Yard. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



Jüri
Doç. Dr. Hakan SAVLI
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

BEYAN

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

Sebahat Akgül (İmza)



İTHAF

Eşim ve oğluma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan ve çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'a teşekkür ederim.

Değerli katkılarından ve desteğinden dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Filiz Aydın'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yapabilmem için bana klinik olanaklarını açan ve yoğun temposuna rağmen her zaman bilgilerini paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Yaşar Kerem Çalışkan'a teşekkür ederim.

Tezimde yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Çiğdem Kekik Çınar'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yapabilmem için bana klinik olanaklarını açan Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Kliniği'nden Dr. Egemen Cebeci'ye teşekkür ederim.

Tezimde yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Aydın Türkmen, Doç.Dr. Halil Yazıcı, Dr. Erol Demir ve Nefroloji Bilim Dalı'nın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı ve destek olan sevgili arkadaşım Dr. Sonay Temurhan'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında bana destek veren Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her an desteklerini hissettiğim sevgili eşim, oğlum ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55868

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. IgA Nefropatisi	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Yaş-Cinsiyet.....	5
2.2. IgA Yapısı ve Türleri	5
2.3. IgA1 Glikozilasyonu	6
2.3.1. N-bağlı Glikozilasyon:.....	7
2.3.2. O-bağlı Glikozilasyon:.....	7
2.3.3. O-glikanların Sentez Basamakları	8
2.4. IgA Nefropati Patogenezi	10
2.4.1. I. Vuruş: Galaktozillenmesi Yetersiz IgA1(GdIgA1) Oluşumu	10
2.4.2. II. Vuruş: Anti-GdIgA1 Otoantikorlarının Üretilmesi.....	11
2.4.3. III. Vuruş: İmmün Tanıma Sonucu Nefritojenik İmmün Komplekslerin Oluşumu	12
2.4.4. IV. Vuruş: Glomerular Hasar.....	13
2.5. IgA Nefropati Tanısı	15
2.5.1. İmmünohistoloji.....	16
2.5.2. Glomerular Kresent.....	16
2.6. COSMC.....	17

2.7. Gen Ekspresyonunun Regülasyonu	19
2.8. Epigenetik Mekanizmalar	20
2.8.1. Kovalent Histon Modifikasyonları.....	21
2.8.1.1. Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu;	21
2.8.1.2. Fosforilasyon:.....	23
2.8.1.3. Ubikuitinasyon ve Sumolasyon:	23
2.8.1.4. Adenozin Difostat (ADP) Ribozilasyonu;	23
2.8.1.5. β -N-asetilglukozamin.....	23
2.8.1.6. Histon Metilasyon:	23
2.8.2. Kovalent Olmayan Mekanizmalar	25
2.8.2.1. Nükleozom Yeniden Şekillendirme	25
2.8.2.2. Histon Varyantları:.....	26
2.8.3. Kodlamayan RNA Aracılı Gen Susturulması	26
2.8.4. DNA Metilasyonu	27
2.8.4.1. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında Direk Mekanizma:.....	29
2.8.4.2. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında İndirek Mekanizma:.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. GEREÇLER.....	31
3.1.1. Hasta grubu	31
3.2. Değerlendirme için uygulanan işlemler	31
3.2.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	31
3.2.2. B Lenfosit izolasyonu	32
3.2.3. B Lenfosit Hücre Kültürü (Kaynak 149)	33
3.2.4. B lenfositlerden DNA İzolasyonu.....	34
3.2.5. B lenfositlerden Total RNA İzolasyonu.....	34
3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	35
3.2.7. Gerçek Zamanlı (Real-time) Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile COSMC mRNA ekspresyon düzey tayini.....	35
3.2.8. RT-PZR ile COSMC geni promoter bölgesinin metilasyon düzey tayini (Kaynak 151).....	38

3.2.9. Hücre kültür süpernatantında ve serumda GdIgA1 düzeyinin ELİSA yöntemi ile ölçülmesi (Kaynak 152).....	40
3.3. İstatistiksel analiz.....	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	63
HAM VERİLER	77
ETİK KURUL KARARI	81
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLOLAR LISTESİ

Tablo 3-1: DNA metilasyon enzim kesimi	39
Tablo 4-1: Çalışma gruplarının demografik ve klinik verileri.....	42
Tablo 4-2: Çalışma gruplarında COSMC DNA metilasyonu, COSMC mRNA ve serum/hücre kültürü süpernatantında GdIgA1 Düzey Analiz Verileri	43
Tablo 4-3: Serum GdIgA1 düzeyi ile klinik ilişki	44
Tablo 4-4: Serum GdIgA1 düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki.....	45
Tablo 4-5: Süpernatant GdIgA1 düzeyi ile klinik ilişki.....	46
Tablo 4-6: Süpernatant GdIgA1 düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki	46
Tablo 4-7: COSMC mRNA seviyesi ile klinik ilişki	47
Tablo 4-8: COSMC mRNA seviyesi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki	48
Tablo 4-9: COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile klinik ilişki.....	48
Tablo 4-10: COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki	49
Tablo 4-11: Çalışma gruplarında GdIgA1 düzeyi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi	50
Tablo 4-12: Çalışma gruplarında COSMC mRNA seviyesi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi.....	51
Tablo 4-13: COSMC DNA metilasyonu üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dünyadaki belli bölgelerde IgAN'nin dağılımı	5
Şekil 2-2: İnsan IgA1 ve IgA2 antikor yapısı	6
Şekil 2-3: Glikozilasyon çeşitleri.....	7
Şekil 2-4: mIgA1 molekülünün glikozillenme bölgesi.....	8
Şekil 2-5: IgA1 glikozilasyon paternleri.....	9
Şekil 2-6: IgA1 ve IgA2 moleküllerinin aminoasit dizisinin karşılaştırılması	9
Şekil 2-7: IgAN Patogenetik Modeli	10
Şekil 2-8: IgA1 menteşe bölgesinin O-glikozillenme yolları	11
Şekil 2-9: IgAN'nde glomerular hasar, podoisit disfonksiyonu ve tubulointerstisyel hasara neden olan yollar.....	14
Şekil 2-10: IgAN'de glomerulus yapısı	15
Şekil 2-11: C1GalT1'in sentezlenmesi ve katlanması.....	18
Şekil 2-12: COSMC ve O-glikan sentezi.....	19
Şekil 2-13: Histon asetilasyonu/deasetilasyonu.....	22
Şekil 2-14: Histon metilasyonu.....	24
Şekil 2-15: Epigenetik regülasyon.....	24
Şekil 2-16: Histonlarda yaygın olarak meydana gelen modifikasyonlar	25
Şekil 2-17: DNA metilasyonu.....	28
Şekil 2-18: Promotör bölgenin metilasyonu ve ekspresyon durumu	28
Şekil 2-19: DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonun baskılanmasında direk mekanizma	29
Şekil 2-20: DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında İndirek mekanizma	30
Şekil 3-1: Akan Hücre Ölçer cihazında B hücrelerin görüntüsü	33
Şekil 3-2: Amplifikasyon eğrisinde CT değerinin gösterilmesi	36
Şekil 3-3: Hasta örneklerinin Gerçek zamanlı PZR görüntüsü.....	37
Şekil 4-1: Çalışma gruplarında serum GdIgA1 düzeyleri	43
Şekil 4-2: Hücre gruplarında çalışma gruplarına göre GdIgA1 düzeyi	50
Şekil 4-3: GdIgA1 düzeyinin gruplar arası değişimi	51
Şekil 4-4: Hücre gruplarında çalışma gruplarına göre COSMC mRNA seviyesi	52
Şekil 4-5: COSMC mRNA seviyesinin gruplar arası değişimi	52

Şekil 4-6: Çalışma gruplarında hücre gruplarına göre COSMC DNA metilasyon oranı	53
Şekil 4-7: COSMC DNA metilasyon oranının gruplar arası değişimi	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Δ :	Delta
β :	Beta
μ l:	Mikrolitre
μ mol:	Mikromol
$^{\circ}$ C:	Santigrad derece
AMI:	Astagalus Membranaceus
Ac:	Asetilasyon
ADP:	Adenozin difosfat
AGTR:	Anjiyotensin II Reseptör
Ang:	Anjiyotensin
AP:	Aktive edici protein, transkripsiyon faktörü
Asn:	Asparajin
ATP:	Adenozin trifosfat
AZA:	5-Aza-2'-deoksitidin
BAF:	BRG-1 ilişkili faktör
BAX:	BCL-2 ilişkili X proteini
BCL:	B-hücre lenfoma
Bç:	Baz Çifti
Big:	Endoplazmik retikulumda bulunan şaperon
BRG:	Brahma ilişkili gen
BRM:	Transkripsiyon düzenleyen Protein SNF2
C:	Sitozin
Camp:	Siklik Adenozin Monofosfat
CBP:	CREB bağlama protein
CBRT:	C1GalT1'in N-terminal bölgesinde bulunan hidrofobik bölge
CD:	Farklılaşma Kümesi (Cluster of Differentiation)
Cdna:	Tamamlayıcı DNA
CDR:	Complementarity Determining Region
c-Myc:	Transkripsiyon Faktörü
CpG:	Sitozin Guanin Adacığı
CREB:	cAMP duyarlı eleman bağlama proteini

CT:	Eşik Değer, threshold cycle
C1GalT1:	Kor 1 β 1,3-galaktoziltransferaz, T sentaz
C1GalT1C1 (COSMC):	C1GalT1'in stabilitesini sağlayan moleküler şaperon
Dk:	Dakika
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT:	DNA metil transferazlar
ELİSA:	Enzim Bağlı İmmünosorbent Test
F primer:	İleri primer
FCS:	Fetal Buzağı Serum
FH:	Fikol
FHM:	Hipermetillenmiş DNA Kesiri
FIM:	Orta Dereceli Metillenmiş DNA Kesiri
FITC:	Floresan izotiyosiyanat
FM:	Metillenmiş DNA Kesiri
FUM:	Metillenmemiş DNA Kesiri
H:	Histidin
G:	Guanin
GalNACT:	N-asetilgalaktozamin Transferaz
GAPDH:	Gliseraldehit-3-fosfatdehidrogenaz
GdIgA1:	Galaktoz yetersiz Immünglobulin A
GFR:	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GlcNAc:	β -N-asetilglukozamin
HAT:	Histon asetiltransferaz
HDAC:	Histon deasetilaz
HDM:	Histon demetilaz
HP1:	Heterokromatin protein
HRP:	Horseradish peroksidaz
HSP:	Henoch-Schonlein Purpurası
HTM:	Histon metiltransferaz
Ig:	İmmünglobulin
IgAN:	İmmünglobulin A Nefropatisi
IL:	İnterlökin

J:	Birleştirici zincir
K:	Lizin
Li:	Lityum
LPS:	Lipopolisakkarit
M:	Metillenmiş DNA
MAPK:	Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MBD:	Metil-CpG bağlanma domaini
Md:	Metilasyon bağımlı kesim
MDRE:	Metilasyon bağımlı
MeCP:	Metile sitozin bağlanma proteinleri
MIgA:	Monomerik İmmünglobulin A1
MiRNA:	mikroRNA
ml:	mililitre
Mo:	Enzim yok
MPA:	Mikofenolik Asit
mRNA:	Haberci RNA
Ms:	Metilasyon-duyarlı kesim
Msd:	Metilasyon duyarlı ve bağımlı çift kesim
MSRE:	Metilasyona duyarlı
Myn:	c-Myc İlişkili Faktör X
ng:	Nanogram
NF-Kb:	Nüklear Faktör Kappa B
OR:	Olasılık oranı
PBAF:	BRG1 ilişkili faktör
PBMC:	Periferik Kan Mononükleer Hücre
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyonu
PE:	Fitoeritrin
PIgA1:	Polimerik İmmünglobulin A1
pmol:	Pikomol
PIgA1:	Polimerik İmmünglobulin A1
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTM:	Posttranslasyonel modifikasyonları
R:	Kesime Dirençli DNA Kopyası

R:	Arjinin
RNA:	Ribo Nükleik Asit
R primer:	Ters primer
RPMI:	Hücre Kültürü Medyumu (Roswell Park Memorial Institute medyumu)
RSC:	Kromatin yeniden şekillendirme kompleksi
SAM:	S-adenozil-L metiyonin
SDBY:	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
Ser:	Serin
SIN3A:	Transkripsiyon düzenleyen Aile Üyesi A
SUMO:	Küçük ubikuitin benzeri modifiye bir molekül
ST3Gal:	Galaktoz α 2,3-siyaliltransferaz
ST6GalNAC:	GalNAc α 2,6-siyaliltransferaz
SW1/SNF:	Nükleozom yeniden şekillendirme kompleksi
ST3Gal:	Galaktoz α 2,3-siyaliltransferaz
ST6GalNAC:	GalNAc α 2,6-siyaliltransferaz
Tn antijeni:	Terminal uçlarında sadece GalNAc taşıyan O-glikan
STn antijeni:	Tn antijenine siyalik asit eklenmesiyle oluşan O-glikan
ST antijeni:	T antijenine siyalik asit eklenmiş O-glikan
TF:	Transkripsiyon Faktörü
TGF:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
Thr:	Treonin
TMB:	Tetra Metil Benzidin
TNF:	Tümör Nekrozis Faktörü
TNFR:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TRD:	Transkripsiyon baskılayan domainine
Ub:	Ubikuitin
UDP-GalNAC:	Uridin 5'-difosfo-N-asetilgalaktozamin
UM:	Metillenmemiş DNA
qRT-PZR:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Akgul, S.U. IgA Nefropatisinde COSMC Geni DNA Metilasyon Profili ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2017.

IgA nefropati (IgAN), son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) yol açan en yaygın glomerüler hastalıklardan biridir. COSMC, C1GALT1 enzimi ile birlikte IgA1'in glikolizasyonunda rol oynayan moleküler bir şaperondur. IgAN hastalarında GdIgA1 seviyesi artarken, COSMC mRNA seviyesinin düştüğü gösterilmiştir, fakat bu mekanizma henüz açıklanmamıştır. Bu çalışmada COSMC gen promoter bölgesinin CpG adalarının metilasyon profiline GdIgA1 düzeyi ve COSMC mRNA seviyesine etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya IgAN tanısı alan 30 hasta, hastalarla birinci derece akrabalığı bulunan 11 sağlıklı kişi ve herhangi bir hastalığı olmayan 6 sağlıklı birey dahil edildi. Hastaların B lenfositlerinde COSMC geninin promoter bölgesinin DNA metilasyonu ve aynı genin ekspresyon düzeyi RT-PCR yöntemi ile serum ve hücre kültür süpernatantındaki GdIgA1 düzeyi ELISA yöntemi ile çalışıldı. Hastaların, hasta yakını ve sağlıklı kontrollere göre serum GdIgA1 düzeyi yüksek, COSMC mRNA seviyesi düşük bulundu. Ancak hastaların COSMC gen promoter bölgesinin DNA metilasyon düzeyindeki artış belirgin değildi. Hastaların B-lenfositleri IL-4 veya 5-Aza-2'-deoksisitidin (AZA) ile muamele edilip kültüre edilmiştir. AZA ile muamele edilen grupta (Grup III) metilasyon hiçbir ajanla muamele edilmemiş gruba (Grup I) göre belirgin olarak azaldığı, COSMC mRNA seviyesinin arttığı ve GdIgA1 seviyesinin azaldığı görüldü. IL-4 ile muamele edilen grupta (Grup II) ise tedavi sonrası, IgAN lenfositlerinde COSMC mRNA seviyesi başlangıca göre belirgin olarak azaldığı fakat COSMC DNA metilasyonundaki artışın belirgin olmadığı görüldü. COSMC geninin promoter bölgesinin DNA metilasyon profilinin IL-4 veya AZA ile değiştirilmesi, IgAN lenfositlerinde COSMC mRNA ve GdIgA1 seviyesindeki değişikliklerle spesifik olarak korelasyon göstermedi. Bulgularımız, IgAN hastalarında düşük COSMC mRNA ve artmış GdIgA1 seviyesini desteklemekle birlikte, COSMC promoter bölgesinin hipermetilasyonunun, IgAN lenfositlerinde COSMC mRNA ekspresyonunun azalması ve GdIgA1 düzeyinin artışı ile ilişkili olabileceğini dair bir yargıya varmamız için yeterli görülmemektedir.

Anahtar Kelimeler: IgA Nefropatisi, COSMC, DNA Metilasyonu, Galaktozillenmesi yetersiz IgA1, MEST Skoru

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:3741.

ABSTRACT

AKGUL, S.U. Investigation of COSMC gene DNA methylation profile and expression level in IGA nephropathy, Istanbul University, Institution of Health Sciences, Department of Medical Biology, Doctorate Thesis. 2017. Istanbul.

IgA nephropathy (IgAN) is one of the most common glomerular diseases that cause end-stage renal disease. COSMC, is a molecular chaperone which has a role in IgA1 glycosylation together with C1GALT1. It was demonstrated that while GdIgA1 increased in IgAN patients, COSMC mRNA level decreased, however this mechanism has not been clarified yet. Researchers investigated the effect of methylation profile of CpG islands in COSMC gene promoter region on GdIgA1 level, and COSMC mRNA in the present study. Thirty patients diagnosed as having IgAN, 11 healthy individuals who were first degree relatives of the patients, and 6 healthy individuals were included in the study. The DNA methylation and expression level of the same gene in promoter region of COSMC gene in B lymphocytes of patients were studied using RT-PCR, and the GdIgA1 level in serum and cell culture supernatant was studied using the enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). Serum GdIgA1 level was found higher, and COSMC mRNA level was lower in patients compared with patients' relatives and healthy controls. However, the increase in DNA methylation level in COSMC gene promoter region of patients were not significant. B-lymphocytes of patients were treated and cultured using IL-4 or 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA). Methylation in Group III, that was treated using AZA, significantly decreased compared with Group I, which was not given any agent, however, COSMC mRNA level increased, and GdIgA1 level decreased. The level of COSMC mRNA in IgAN lymphocytes significantly decreased after treatment compared to the beginning in Group II, that was treated using IL-4, however, the increase in COSMC DNA methylation was not significant. The change of DNA methylation profile of COSMC gene promoter region using IL-4 or AZA did not indicate any correlation with the changes in COSMC mRNA and GdIgA1 levels in IgAN lymphocytes. Although our findings support low levels of COSMC mRNA and increased GdIgA1 levels in IgAN patients, it does not provide sufficient information to make a judgement that the hypermethylation of COSMC promoter region was associated with the decrease in COSMC mRNA expression in IgAN lymphocytes, and the increase in GdIgA1 level.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmünglobulin (Ig) A nefropatisi (IgAN) dünyada en yaygın görünen primer glomerulonefrittir (1). Çoğunlukla sessiz seyretmesine rağmen; hastaların %30-40'ında son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişmektedir. Hastalığın kesin tanısı böbrek biyopsisi ile konulabilmektedir. Birçok ülkede biyopsilere yönelik seçici yaklaşım göz önüne alındığında, hastalığın görülme sıklığında bölgesel farklılıklar bulunmaktadır. Hastalık en sık Kafkasya ve Asya popülasyonunda görülmektedir (2).

Hem erişkin hem de çocuk hastalarda, IgAN'nın belirgin özellikleri mezanjiyal hipersellülarite ve glomerüler mezanjiyumda IgA birikimidir. Hastalıkta primer defekt, IgA1'in menteşe (bağlantı) bölgesinin anormal glikozillenmesidir. IgA1'in kusurlu glikozilasyonu ile başlayan süreç, Galaktozilenmesi yetersiz IgA1 (GdIgA1)'in aşırı üretimi, anti-GdIgA1 oluşumu ve nefritojenik immün komplekslerin mezanjiyumda birikmesi ile sonuçlanır (2).

IgAN hasta serumlarında GdIgA1 seviyesi oldukça yüksek bulunmuştur (2). C1GalT1 enzimi, GalNAc kalıntılarına sağlıklı bireylerde galaktoz molekülünü eklerken, IgAN hastalarında, IgA1'e galaktoz molekülünden önce siyalik asit eklemektedir. Siyalik asit eklenmesi, galaktoz eklenmesini engellemekte ve böylece galaktozillenmesi yetersiz glikanların oluşmasına neden olmaktadır (32). C1GalT1 enzimlerinin ekspresyonu için COSMC (C1GalT1C1) gerekmektedir. COSMC, endoplazmik retikulumda bulunan moleküler bir şaperondur (72). COSMC, yeni sentez edilmiş C1GalT1 enzimi ile etkileşime geçerek, kümeleşmesini ve proteozomal parçalanmasını engelleyerek, aktif formda kalmasını sağlamaktadır (73-77).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, COSMC ekspresyonunun regülasyonu tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte COSMC geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu ile epigenetik olarak susturulduğu ve böylece COSMC ekspresyonunun azaldığı düşünülmektedir (96). Bunun sonucunda aktif olmayan bir C1GalT1 oluştuğu ve böylece O-glikanları olmayan Tn ve sTn antijenlerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (82). Tn antijeninin aşırı ekspresyonu, Tn sendromu, IgA nefropatisi ve insan tümörleri dahil bazı hastalıklarda görülmektedir (88-90).

Bu tez çalışmasına, yapılan fizik muayene, laboratuvar testleri ve böbrek dokusunun histopatolojik inceleme sonucu IgAN tanısı almış fakat immünsüpresif ajan kullanmamış 30 olgu, hastalarla birinci derece yakınlığı olan sağlıklı 11 kişi ve kontrol grubu olarak herhangi bir akut ve/veya kronik böbrek hastalığı bulunmayan 6 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Çalışma için hasta, hasta yakını ve sağlıklı bireylerden ayrılan B lenfositleri üç farklı gruba ayırarak (blank, IL-4, 5-Aza-2'-deoksisitidin (AZA)) 72 saat kültüre edilmiştir. Herbir gruptan DNA, RNA ve süpernatant ayrılmıştır. B hücre Ribonükleik asit (RNA)'den COSMC geninin RT-PCR ile mRNA seviyesi, genomik deoksiribonükleik asit (DNA)'den, COSMC geninin promoter bölgesini DNA metilasyon profile RT-PCR ile çalışılmıştır. Hücre kültür süpernatantı ve serumda GdIgA1 düzeyi ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Bu çalışmada; GdIgA1'in oluşmasında etkili olduğu sanılan COSMC geninin ekspresyon derecesini belirleyen promoter bölgesinin metilasyon profili incelendi. IgAN hastalarında COSMC geninin promoter bölgesinin DNA metilasyon derecesi ile hücre kültür süpernatantında GdIgA1 düzey değişiklikleri arasındaki ilişki incelendi. Böylece COSMC gen promoter metilasyonu ile COSMC mRNA ekspresyon seviyesi ve GdIgA1 düzeyi arasındaki bağlantının gösterilmesi amaçlandı. Ayrıca hastaların klinik ve patolojik verileri ile bu parametrelerin herbiri ayrı ayrı incelenerek, bu parametrelerin IgAN tanı, izleme ve prognoz kararına uygun bir indeks olup olmadığının değerlendirilmesi yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. IgA Nefropatisi

İmmünglobulin (Ig) A nefropatisi (IgAN) dünyada en yaygın görünen primer glomerular patolojidir. İlk kez 1968 yılında Berger ve Hinglais tarafından hematürisi olan hastaların böbrek dokusunda "interkapiller IgA-IgG birikimi" olarak tanımlanmıştır (1). Hastalıkta primer defekt, IgA1'in menteşe (bağlantı) bölgesinin anormal glikozillenmesidir. Bu hastaların serumlarında galaktozillenmesi yetersiz IgA1 (GdIgA1) seviyesi oldukça yüksek bulunmuştur (2).

IgAN, çoğunlukla sessiz seyretmesine rağmen; hastaların %30-40'ında son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) ile sonuçlanmaktadır. Günümüzde IgAN tanısı sadece böbrek biyopsisinin histopatolojik incelenmesi ile konulabilmektedir. IgAN patolojisi, glomerular mezenjiyumda polimerik IgA1 (pIgA1) immün kompleks (nadiren IgG veya IgM olabilir) birikimi, mezenjiyal hücre proliferasyonu, T hücre, monosit ve/veya makrofaj infiltrasyonu ve ekstrasellüler matriks artması ile karakterizedir. Gastrointestinal ve üst solunum yolu infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların antijenleri IgAN hastalarında nefritojenik IgA1 antikörlerinin salınımını tetiklemektedir. Nefritojenik IgA1 antikörleri özellikle bademcik iltihabını takiben B hücreleri tarafından üretilmektedir (2).

GdIgA1 molekülü sadece böbreğin glomerular mezenjiyal bölgesinde birikir. Tubulo epitelyal hücreler ve podositlerde IgA reseptör ekspresyonu olmadığı için birikim görülmez (2).

Hastalarda, böbrek hasarı nedeniyle şiddetli hipertansiyon, hematüri veya proteinüri gibi bir dizi semptomlar ortaya çıkmaktadır. IgAN'de böbrek biyopsisinde görülen tubulointerstisyel hasarın şiddeti ve glomeruloskleroz histolojik prognostik belirteçlerdir (3).

IgAN hastalarının %90-95'i sporadik olarak meydana gelirken %5-10 oranında da ailesel olarak görülmektedir. Ailesel IgAN hastalarının prognozu sporadik olanlara göre daha kötüdür ve böbrek yetmezliği gelişme riski %64'tür. Sporadik olarak meydana gelen hastalarda ise bu oran %8 olarak bulunmuştur. Ailesel IgAN hastalarının serum GdIgA1 seviyesi, sporadik IgAN hastalarının serum seviyelerinden daha yüksek

bulunmuştur. Ailesel IgAN hastalarından izole edilen pIgA1'in sporadik olanlara göre mezenjiyal hücrelerin reaktivitesini daha fazla artırdığı bildirilmiştir. Mezenjiyal hücre reaktivitesi, daha az oranda olmakla beraber ailesel IgAN hastalarının asemptomatik akrabalarında da gösterilmiştir. Bu durum asemptomatik hasta yakınlarında hastalık gelişim potansiyelini ortaya koymaktadır. Alternatif olarak, glomerular mezanjiyumda pIgA1 seviyesinin patolojik olayların tetiklenmesine yetecek kadar yüksek bir eşiğe ulaşmalıdır (4). Hastalığın ortaya çıkması için farklı genetik ve çevresel faktörler gerekebilir. Çalışmalar genetik faktörlerin ailesel IgAN patogenezinin yanı sıra sporadik IgAN patogenezinin de katıldığı fikrini desteklemektedir (5,6). Farklı etnik gruplarda IgAN patogenezinde risk faktörü olduğu düşünülen aday genler tespit edilmiştir (7,8).

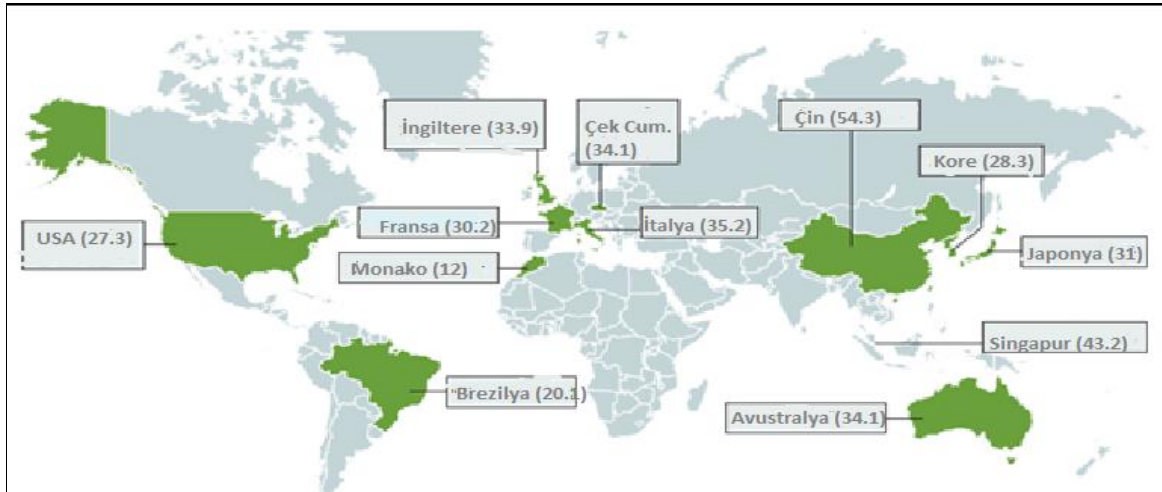
2.1.1. Epidemiyoloji

IgAN tanısı için biyopsinin gerekli olduğu göz önüne alındığında, inatçı mikroskobik hematüri ve/veya hafif proteinüri için biyopsi yapılan bireylerden elde edilen veriler IgAN sıklığını arttırabilir. Tek merkezli çalışmalarda böbrek biyopsisi yapılmış olan primer glomerulonefritlerin Amerika Birleşik Devletlerinde %10-20'sinin, Avrupa ülkelerinde %20-30'unun ve Asya ülkelerinde ise %40-50'sinin IgAN olduğunu göstermiştir (9). Türkiye'de ise primer glomerulonefrit hastalarının %17,2'sinin IgAN olduğu bildirmiştir (10).

Afrika gibi gelişmekte olan popülasyonlarda düşük proteinüri ve mikroskopik hematürisi olan hastalara biyopsi yapılmadığı için IgAN sıklığının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (11). Buna karşın Wyatt ve arkadaşları (12) Afro-Amerikan ve Avrupa-Amerikan hasta grupları ile yaptıkları çalışmalarında IgAN sıklığının benzer olduğunu göstermişlerdir. IgAN görülme sıklığı ülkeden ülkeye hatta ülkelerin kendi içinde farklılık gösterebilmektedir (Şekil 2-1). Gelişmekte olan ülkelerde birinci basamak sağlık hizmetleri eksikliği kısmen bu bölgeler için IgAN'nin düşük sıklığını açıklayabilir. Aynı şekilde gelişmiş ülkelerde, hastalığın yüksek sıklıkta görülmesi birinci basamak sağlık hizmetleri ve etkin takip yöntemlerinin daha iyi olması ile açıklanabilir (9).

IgAN'nin görülme sıklığını etkileyen diğer bir faktör, böbrek biyopsi endikasyon kriterleridir. Nitekim tek merkezli çalışmalar karşılaştırıldığında, biyopsi politikalarındaki farklılıklar nedeniyle hastalığın görülme sıklığında da farklılıklar olduğu görülmektedir. Birleşik Krallık'ta, Sissons ve arkadaşları (13) tarafından yapılan

çalışmada IgAN'si %4 gibi düşük sıklıkta görülürken, böbrek biyopsisi için daha geniş endikasyonlar kullanan Power ve arkadaşlarının (14) yaptığı çalışmalarında primer glomerulonefrit sıklığı %38 olarak gösterilmiştir. Liu ve ark.'ları (15), devamlı hematürisi olan mikroskobik hematürisi olan kişilere yapılan biyopsilerde % 43 sıklıkta IgAN tanısı aldığını bildirmiştir.



Şekil 2-1: Dünyadaki belli bölgelerde IgAN'nin dağılımı

2.1.2. Yaş-Cinsiyet

IgAN sıklığı, çocuklarda ve genç yetişkinlerde (20–30 yaş) 65 yaş üstü bireylerden daha yüksektir (16,17). İlk yayınlar beyaz erkeklerde IgAN'nin daha yaygın olduğunu göstermiştir (18). Ancak bölgesel kayıtlarda, cinsiyete göre hastalığın görülme sıklığında fark olmadığı saptanmıştır (19).

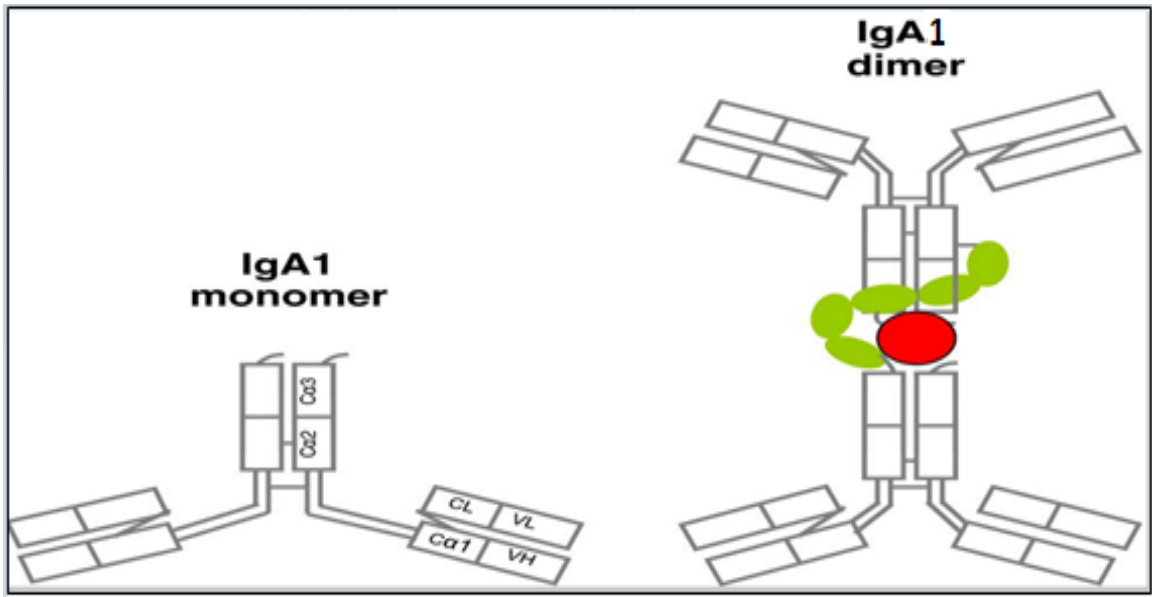
2.2. IgA Yapısı ve Türleri

IgA tipi antikorlar, ilk kez 1953 yılında serumda tanımlandı. İnsan vücudunda en çok üretilen antikor izotipidir. İnsan IgA'nın, IgA1 ve IgA2 olarak iki alt sınıfı vardır ve her ikisi monomerik (mIgA) veya pIgA formları halinde olabilir. Total serum IgA'nın yaklaşık %85'i mIgA1 formu olup yalnızca 10%'u dimerik ya da polimeriktir. Mukozal IgA'nın ise neredeyse tamamı polimeriktir. Dolaşımdaki sistemik IgA'nın kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğinde üretilen IgA çoğunlukla mIgA1 olup, bu antikorlar genellikle serumda bulunur (20). Serum mIgA, iki ağır ve iki hafif zincirden oluşur. Ağır zincirlerin herbiri bir değişken ve üç sabit bölge içerir. Hafif zincirlerin herbiri bir değişken ve bir sabit bölge taşır. Ağır zincir, 14. Kromozomda yer alan iki farklı gen ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$) tarafından kodlanır (20,21). IgA, hangi gen tarafından kodlanıyorsa ona göre

isimlendirilir. Aralarındaki temel fark, IgA2'nin, menteşe bölgesinin daha kısa olmasıdır. Bu fark IgA2'yi gastrointestinal ve solunum sistemi lümenindeki bakteriyel proteazlara karşı daha dayanıklı kılar (22).

Sistemik immün yanıtta serum IgA'nın fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Serumdaki mIgA, komplemanın klasik yolağı ile ilişkisizdir. Ancak FcR α reseptörleri ile fagositik sistemi aktive edebilir (23). Böylece yabancı antijen ve IgA tarafından oluşturulan immün kompleks dolaşımında fagositik sistemce temizlenir (24,25).

Lümen salgısında baskın bulunan dimerik IgA, total IgA'nın üçte ikisinden fazlasını oluşturur (26,27). Dimerik IgA'ların çoğunu IgA2 izotipi oluştursa da IgA1 izotipinin de dimer formu vardır. Dimer yapı Fc kısmının terminal sabit bölgesine bağlanmış birleştirici zincirin (J, join) kovalent etkileşimi ile meydana gelir (20) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: İnsan IgA1 ve IgA2 antikor yapısı

(Kırmızı yuvarlak: J-zincir, Yeşil domain: salgısal parça)

2.3. IgA1 Glikozilasyonu

Glikozilasyon, enzimatik reaksiyonlarla sakkaritlerin proteinlere, lipitlere veya organik moleküllere bağlanmasıdır. Protein glikozilasyonu, protein sentezi sırasında veya hemen sonrasında meydana gelmektedir. Glikolizasyon; N-bağı ve O-bağı olmak üzere iki farklı biçimde olabilmektedir (28,30).

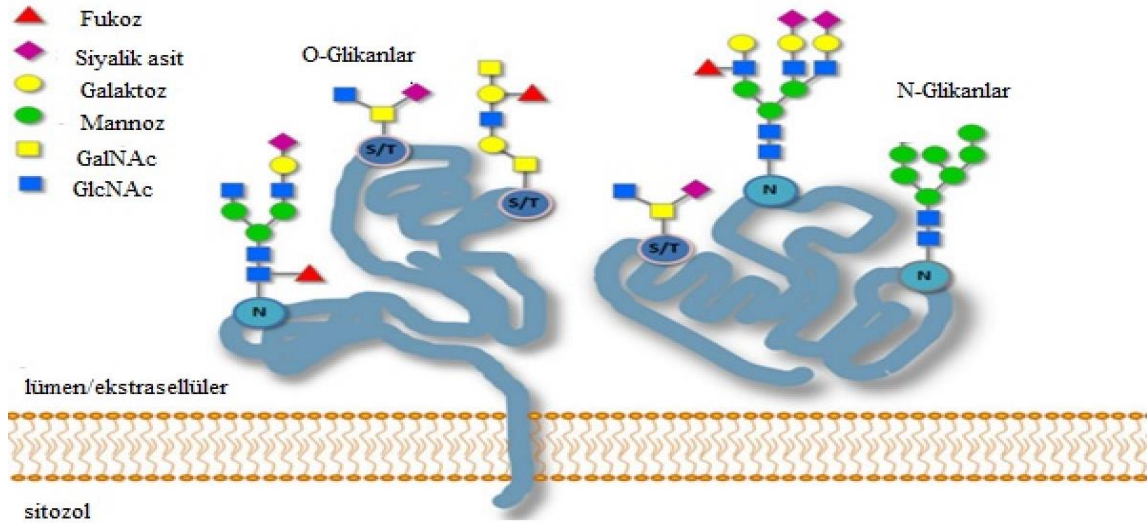
2.3.1. N-bağlı Glikozilasyon:

Oligosakkaritler, hedef proteindeki asparajin (Asn) aminoasitine önce 14 şekerli bir öncül olarak eklenir. Bu öncülün yapısı çoğu ökaryotta 3 glukoz, 9 mannoz ve 2 *N*-asetilglukozamin molekülü şeklindedir. Karmaşık tepkimeler dizisi ile bu dallı zincir dolikol adı verilen bir taşıyıcı moleküle eklenir ve sonra hedef protein endoplazmik retikulum (ER) lümenine geçerken polipeptit üzerinde uygun yere aktarılır (28).

IgA1 ağır zinciri, biri C2 (Asn263) domaininde diğeri C3 (Asn459) domaininin son kısmında yer alan iki tane *N*-glikan taşır (28,29).

2.3.2. O-bağlı Glikozilasyon:

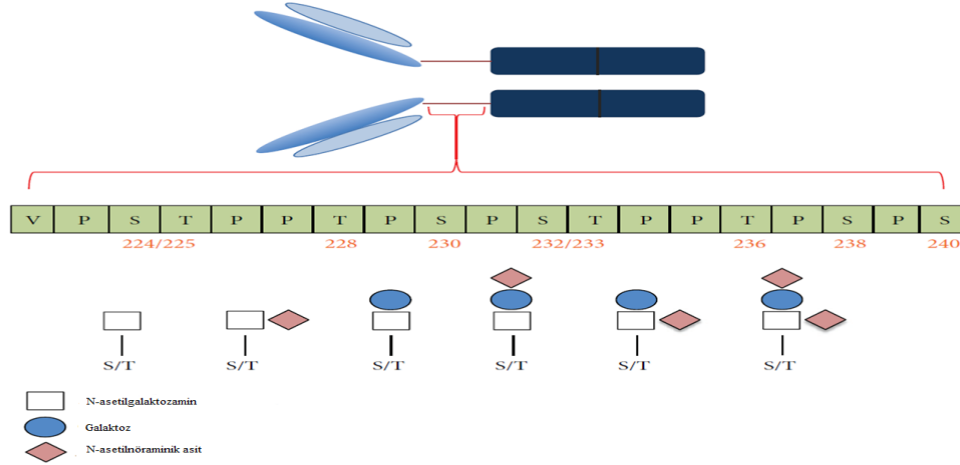
O-glikozilasyon daha çok membrana bağlı proteinlerde görülsede çok az sayıda serum proteinlerinde de görülebilmektedir. Bunlar genellikle Serin (Ser) veya Treonin (Thr) kalıntılarına bağlı daha basit karbonhidratlardır (Şekil 2-3). O-bağlı glikozilasyonda proteine eklenecek şeker molekülü Uridin 5'-difosfo-*N*-asetilgalaktozamin (UDP-GalNAc)'den elde edilir. *N*-asetilgalaktozamin Transferaz (GalNAcT) enzimi ile proteinin Ser veya Thr kalıntılarına GalNAc eklenmesi glikolizasyonu başlatır. Bu süreç Golgi de meydana gelir (30,31).



Şekil 2-3: Glikozilasyon çeşitleri

IgA1, *N*-bağlı ve *O*-bağlı glikanlara sahip çok az sayıda serum proteinlerinden biridir. IgA1'in ağır zincirinin C1 ve C2 sabit domainleri arasında menteşe bölgesi bulunur. Bu bölgede dokuz tane Ser ve Thr aminoasiti vardır. Bu aminoasitler potansiyel *O*-glikozilasyon bölgeleridir. Dokuz bölgenin sadece üç ile altı tanesi

glikozile olduğundan her bir mIgA molekülü en fazla 12 glikan bulundurabilir (2,32,33) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: mIgA1 molekülünün glikozillenme bölgesi

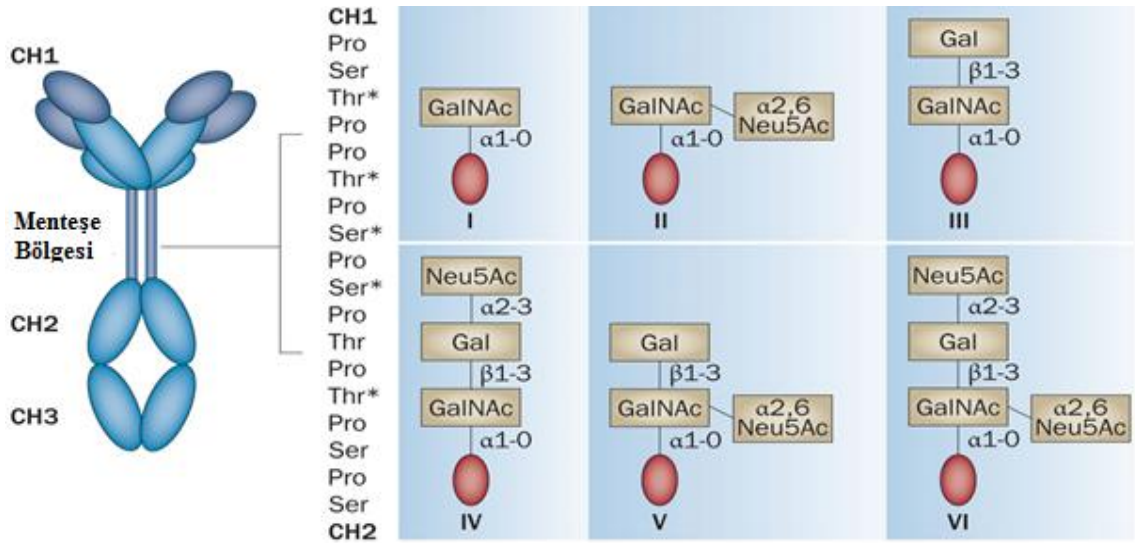
O-glikanlar peptit zincirine genellikle Ser/Thr kalıntılarından oksijen atomları ile bağlanırlar. IgA1 molekülü için çeşitli glikozilasyon paternleri tanımlanmıştır. Bu glikanlar genellikle başlangıç şekeri olarak GalNAc bulundurmaktadır. İkinci şeker olarak GalNAc'a bağlı galaktoz taşımaktadırlar. Son şeker olarak da, GalNAc-siyalik asit (N-asetilnöraminasit, NeuNAc) ve/veya galaktoz-siyalik asit gibi bir siyalik asit bulundurmaktadırlar. O-glikozilasyon her seferinde tek bir şekerin aşamalı olarak moleküle eklenmesi ile gerçekleşmektedir. İnsanlarda 20 farklı izotipi bulunan GalNAc-T ailesi bu eklenmeyi Ser/Thr aminoasitlerine ilk şekeri ekleyerek başlatmaktadır (30-33).

Normal serum IgA1 üzerindeki en çok bulunan O-glikanlar, GalNAc-galaktoz disakkaridi ve bunların mono-siyalize veya di-siyalize formlarıdır. Fakat bunların dışında anormal glikozillenme paternleri de bulunmaktadır (2,32,34) (Şekil 2-5).

2.3.3. O-glikanların Sentez Basamakları

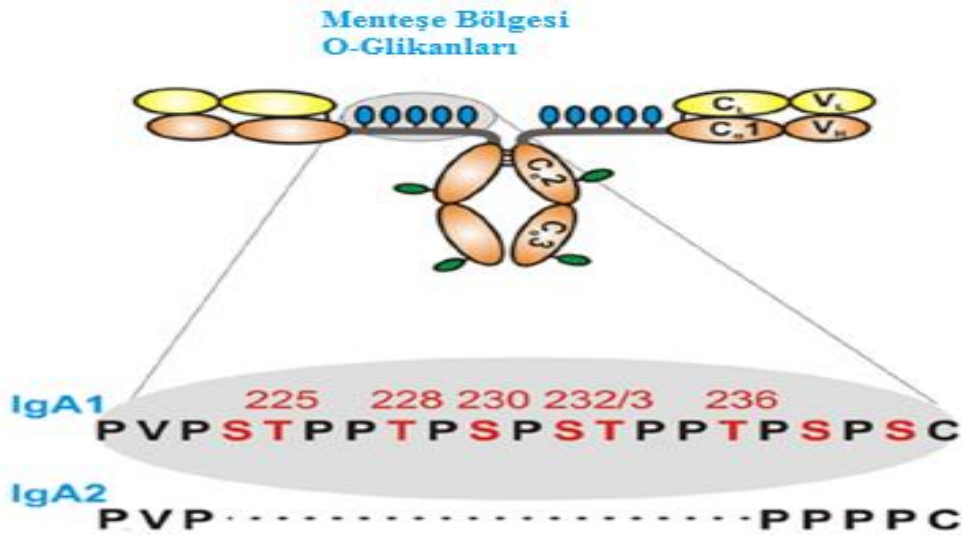
1. GalNAc-T katalizörlüğünde proteine GalNAc eklenmesi
2. Kor 1 β 1,3-galaktoziltransferaz (C1GalT1;T sentaz) ve COSMC (C1GalT1'in stabilitesini sağlayan moleküler şaperon-C1GALT1C1) katalizörlüğünde GalNAc'a galaktozun eklenmesi
3. GalNAc-galaktoz disakaridine siyalik asitin eklenmesi

Galaktoza siyalik asit ekleyen enzim, Gal α 2,3-siyaliltransferaz (ST3Gal), GalNAc'a siyalik asit ekleyen enzim ise GalNAc α 2,6-siyaliltransferaz (ST6GalNAc)'dır (32,33).



Şekil 2-5: IgA1 glikozilasyon paternleri

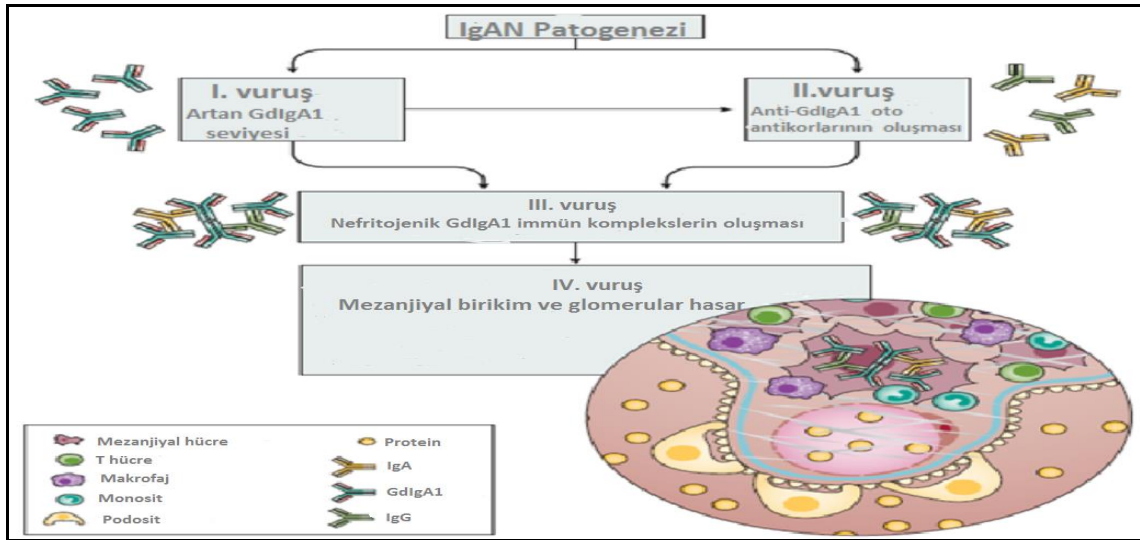
IgA2 menteşe bölgesi IgA1'inkine göre oldukça kısadır ve Ser/Thr kalıntısı taşımaz. Bu yüzden O-glikanları yoktur (32) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: IgA1 ve IgA2 moleküllerinin aminoasit dizisinin karşılaştırılması

2.4. IgA Nefropati Patogenezi

IgAN'nın, otoimmün bir hastalık olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. IgAN patogenezi için 'Çok tesirli virüs' hipotezi ileri sürülmüştür (2,32,35,36) (Şekil 2-7).



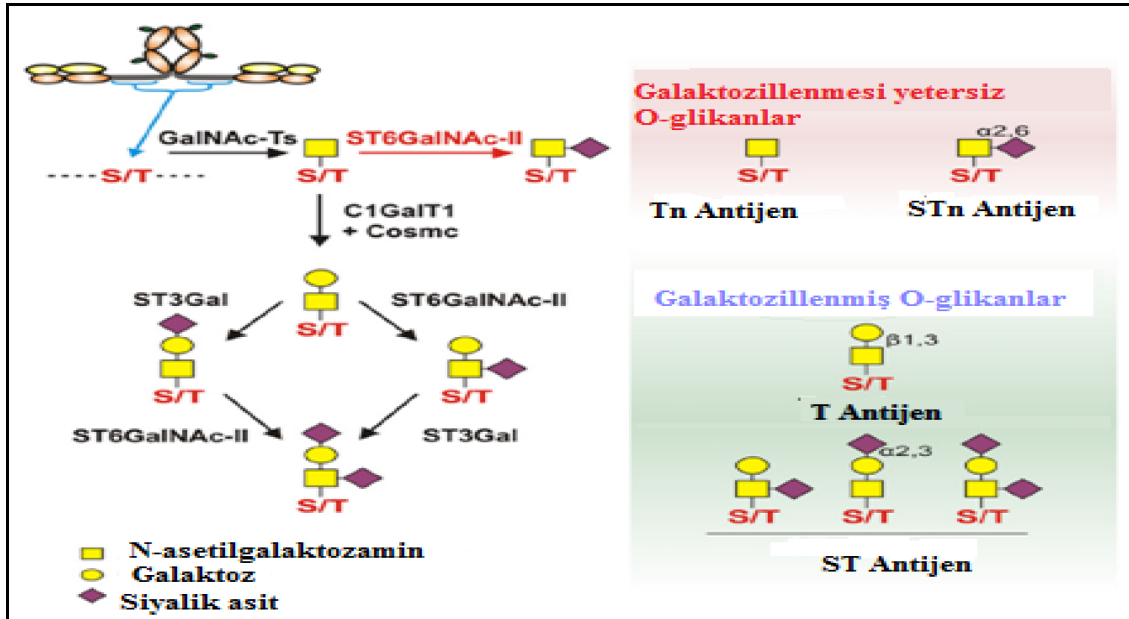
Şekil 2-7: IgAN Patogenetik Modeli

2.4.1. I. Vuruş: Galaktozillenmesi Yetersiz IgA1(GdIgA1) Oluşumu

IgAN'nın karakteristik molekülü GdIgA1, B hücreleri tarafından üretilmektedir (37). IgA1 menteşe bölgesinin O-glikozilasyonu golgi aygıtında GalNAcT enzimi tarafından Ser/Thr aminoasitlerine GalNAc'nin eklenmesi ile başlamaktadır. İkinci aşamada sağlıklı bireylerde GalNAc kalıntılarına C1GalT1 enzimi galaktoz molekülünü eklerken, IgAN hastalarında, galaktoz molekülünden önce ST6GalNAc enzimi tarafından siyalik asit eklenmektedir (Şekil 2-8, kırmızı ok). GalNAc kalıntılarına galaktozdan önce siyalik asit eklenmesi galaktoz eklenmesini engeller ve böylece galaktozillenmesi yetersiz glikanların oluşmasına neden olur (32).

IgAN hastalarında C1GalT1 ve COSMC (C1GALT1C1) aktivitesinin azaldığı, ST6GalNAc-II aktivitesinin ise arttığı gösterilmiştir. Bu durum artan GdIgA1 düzeyinin artışı ile ilişkilendirilmiştir (37-40). İnterlökin (IL)-6 ve IL-4 gibi sitokinler GdIgA1 üretiminden sorumlu enzimlerin ekspresyonunu değiştirebilmektedir. IgAN hastalarının hücreleri IL-6 ile stimüle edildiğinde, siyalik asiti ekleyen ST6GalNAc aktivitesinin arttığı görülürken galaktozu ekleyen C1GalT1 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. IL-4 sitokininin ise sadece C1GalT1 aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (41). Spesifik

glikoziltransferazların gen ekspresyonlarını microRNA (miRNA)'lar da düzenleyebilmektedir (42).



Şekil 2-8: IgA1 menteşe bölgesinin O-glikozillenme yolları

Galaktozillenmesi yetersiz O-glikanlar;

Tn antijeni; Terminal uçlarında sadece GalNac taşıyan (GalNAcα1-O-Ser/Thr) O-glikanlardır.

STn antijeni; Tn antijenine siyalik asit eklenmesiyle oluşan O-glikanlardır.

Tn ve STn antijenleri sağlıklı hücrelerin yüzeyinde bulunmayıp genellikle kanser hücrelerinde bulunmaktadır (32).

Galaktozillenmesi normal O-glikanlar;

T (Thomsen-Friedenreich) antijeni: Tn antijenine galaktoz eklenmesi ile oluşan O-glikandır.

ST antijeni: T antijenine siyalik asit eklenmiş O-glikandır.

T ve ST antijenleri sağlıklı hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır (32).

2.4.2. II. Vuruş: Anti-GdIgA1 Otoantikorlarının Üretilmesi

IgAN hastalarında GdIgA'e karşı gelişen otoantikorların büyük bir bölümü IgG izotipidir. Otoantikorlar, IgA1'in ağır zincirin terminal GalNAc kalıntılarını tanımaktadırlar (38, 43). Yapıları, IgAN hastalarından elde edilen klonlanmış hücre

hatları ile yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu otoantikörlerin ağır ve hafif zincirlerindeki antijen bağlama bölgelerine ait dizilerinin belirlenmesi, ağır zincirlerin çok değişken bölgesinin (CDR3; Complementarity Determining Region) yapısı hakkında ayrıntılı bilgi edinmemizi sağlamıştır. Bu analizler, sağlıklı bireylerde antikörün CDR3 bölgesi üçüncü pozisyonunda alanin amino asiti olduğunu gösterirken IgAN hastalarında antikörün aynı pozisyonda Ser amino asiti olduğunu göstermiştir (38, 44). Ayrıca IgAN hastalarında CDR3 bölgesinin sağlıklı kontrollere göre daha uzun olabileceği bildirilmiştir. Bu bulgular, CDR3'ün GdIgA1'e bağlanma noktasında Ser kalıntılarının bulunduğunu göstermiştir. IgAN hastalarında IgG otoantikörlerinin CDR3 bölgesi üçüncü pozisyonda Ser aminoasitinin bulunmasının VH gen somatik mutasyonlarından kaynaklandığını gösteren bir çalışma bulunmaktadır (45).

IgAN patogeneğinde IgG tipi otoantikörlerin önemi bilinirken IgA1 tipi otoantikörlerin rolü ve önemi anlaşılamamıştır (46,47).

2.4.3. III. Vuruş: İmmün Tanıma Sonucu Nefritojenik İmmün Komplekslerin Oluşumu

IgG ve/veya IgA1 otoantikörleri GdIgA1'e bağlanarak immün kompleksleri oluşturmaktadırlar. Bu otoantikörlerin yapısı, IgAN hastalarından klonlanmış hücre hatları ile yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (38). Bu komplekslerin biyolojik aktiviteleri, kompleksin büyüklüğü ve bileşimine bağlı olarak değişebilmektedir (4,38,48).

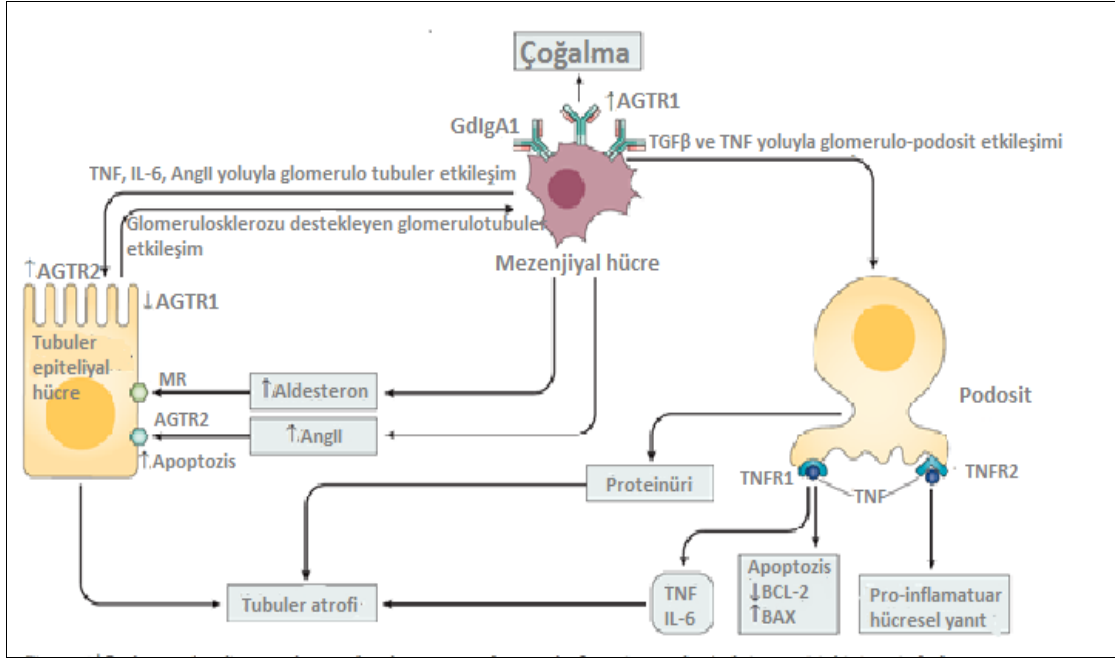
GdIgA1 molekülleri polimerleşme eğilimindedir. IgG tipi otoantikörler (anti-glikan antikörleri) polimerik GdIgA1'lerin menteşe bölgesine veya ağır zincirindeki GalNAc kalıntılarına bağlanarak immün kompleksleri oluşturmaktadır (38,46). Günümüzde IgAN hastalarının dolaşımında immün komplekslerin (GdIgA1+ anti-glikan antikörleri) bulunduğu kabul edilmektedir (49,50). IgAN hayvan modeli ile yapılan bir çalışma, immün kompleks oluşumu ve glomerular GdIgA1 birikiminde IgA1'in glikozilasyon derecesi ve menteşe bölgesinin kompozisyonunun önemli olduğunu göstermiştir (51).

Serumda artmış GdIgA1 seviyesi IgAN hastalarının yanı sıra Henoch-Schonlein Purpurası (HSP) olan hastalarda da gösterilmiştir (52). Bu durum immün komplekslerin glomerular birikiminin HSP ve IgAN ortak etyopatogenezi olduğu düşüncesine yol açmıştır (53,54).

2.4.4. IV. Vuruş: Glomerular Hasar

Normal bir glomerulusun podositlerinde hasar olmadığı sürece proteinüri olmaz. IgAN'de ise, glomerular mezanjiumda polimerik GdIgA1 içeren immün komplekslerin birikmesi sonucu podosit hasarı meydana gelir ve proteinüri gelişir (55,56). İmmün komplekslerin mezanjiyumda birikmesi, mezanjiyal hücrelerin aktivasyonuna neden olarak hücre çoğalmasını tetikler ve tümör nekrozis faktörü (TNF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF β), IL-6 ile anjiyotensin II (Ang II) gibi pro-enflamatuar ve profibrotik mediatörlerin salınmasına neden olur. In vitro çalışmalarda, mezanjiyal hücrelerden salınan bu sitokinlerin, glomerular filtrasyon membranının hasarına neden olarak proteinüri ve hematüriye neden olduğu gösterilmiştir (57,58).

İmmün komplekslerin birikimi, yalnızca mezanjiyal hücrelerde olup diğer yapılarda (örneğin; podosit veya tubül epitel hücrelerinde) olmamaktadır. GdIgA1'in mezanjiyal hücrelere bağlanmasından sonra bu hücreler tarafından salgılanan TNF, podositleri uyarak TNF sentezlemesine neden olur. Podositlerden salınan TNF ise otokrin etkiyle daha fazla TNF salınımına neden olmaktadır. TNF etkisi aynı zamanda, podosit yüzeyindeki TNF reseptör 1 ve 2'nin (TNFR1 ve TNFR2) ekspresyonunu artırmaktadır. TNFR1 reseptörlerine bağlanan TNF ise, B-hücre lenfoma (BCL)-2 seviyesinin düşmesine ve BCL-2 ilişkili X proteini (BAX) seviyesinin de artmasına neden olarak apoptozu doğrudan tetikleyebilmektedir. TNF etkisi ayrıca IL-6 sentezini artırmaktadır. IL-6, tubuler anjiyotensin II reseptör tip 1 (AGTR1) ve Ang II ekspresyonunu artırmaktadır. Ang II ve AGTR1'in etkileşimi, protein kinaz C ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ederek tubulointerstisyel alanda inflamasyon oluşumuna neden olmaktadır. AGTR2'nin aktivasyonu da, MAPK yolunu baskılayarak apoptoz gelişimini artırmaktadır. Mezanjiyal hücrelerden salgılanan aldosteron, Ang II ile sinerjik hareket ederek böbrek tubul epitel hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır. TNF'in TNFR2'ye bağlanması, pro-inflamatuar hücresel yanıtı tetiklemektedir (56-58) (Şekil 2-9). Podosit ve tübüler epitel hücrelerinde artan apoptoz proteinüriye neden olmaktadır. Bu süreç, çeşitli çevresel ve genetik faktörler tarafından da düzenlenmektedir (16,59).



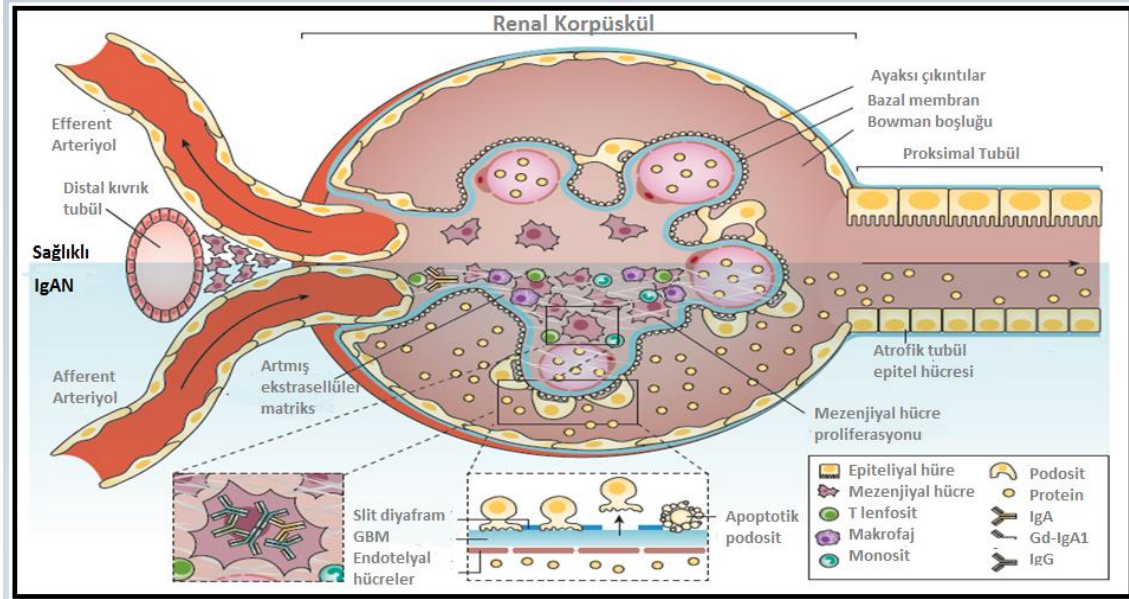
Şekil 2-9: IgAN’nde glomerular hasar, podosit disfonksiyonu ve tubulointerstiyel hasara neden olan yollar

Bazı hastalarda belirgin interstisyel skar oluşumu olmaksızın mezanjiyal matris ile hücre sayısında minimal artış görülür. Bazılarında ise glomeruloskleroz ve/veya tubulointerstiyel fibrozis ile karakterize daha kalıcı hasar meydana gelir ve bu hastalarda SDBY gelişmektedir (60).

IgAN hastalarındaki glomeruloskleroz, podositopeninin yanı sıra podokaliksin ve dendrin (glomeruler slit diyafram bileşeni) gibi podosit bileşenlerindeki değişim ile ilişkilendirilmiştir. Podokaliksin, podositler ve endotel hücreleri tarafından glomerulogenez sırasında sentezlenir. Negatif yüklü podokaliksin, bitişik ayaklı uzantıları birbirinden ayırır ve Bowman aralığı içine plazma filtratının geçişi için slit diyaframın açık kalmasını sağlar. Podosit hasarı, podositlerin glomerular bazal membrandan ayrılması, apoptoz, nekroz ve kusurlu otofaji gibi süreçleri kapsar (Şekil 2-10) (61-63).

Kompleman aktivasyonunun, inflamasyon ve glomerular hasarı arttırdığı düşünülmektedir. İmmün kompleks ve mezanjiyal GdIgA1 birikimi, hem alternatif kompleman yolağını hem de mannoz bağlayıcı lektin yolağını aktive edebilir. Komplemanın aktive olabilmesi IgA1’in glikozilasyon derecesine ve IgA komplekslerinin molekül ağırlıklarına (dimerik IgA, pIgA ve IgA-immün kompleksi)

bağlıdır. Ayrıca glomerular endokapiller duvarında IgA, IgG antikorları ile kompleman 3 birikimi podosit hasarını tetikleyebilmektedir (64).



Şekil 2-10: IgAN'de glomerulus yapısı

2.5. IgA Nefropati Tanısı

IgA Nefropatisinin tanısı günümüzde böbrek biyopsisinin histopatolojik olarak incelenmesi ile konulmaktadır. 2009 yılında Bileşik Krallığın Oxford şehrinde 11 ülkedeki 15 merkezin uzmanları ile ortak bir konsensus raporu oluşturulmuştur. Bu raporda hem klinisyenler hem de patologlar için hastanın prognozuna etki eden histopatolojik veriler hakkında ortak bir dil oluşturulması amaçlanmıştır (65,66)

Bu sınıflama ile mezanjiyal hiperselülarite (M), endokapiller hiperselülarite (E), segmental glomeruloskleroz (S) ve tübuler atrofi/interstisyel fibrozis (T) olmak üzere dört değişkenin birbirinden bağımsız olarak hastalık progresyonunun öngürülmesinde prognostik değeri olduğu gösterilmiş, bu kriterlerin hepsinin baş harfleri birleştirilerek 'MEST' kriterleri oluşturulmuştur. Bu kriterlerin etnik köken ve yaştan bağımsız olarak prognostik öneminin olduğu belirlenmiştir (67). Daha öncesinde yapılmış ve Avrupadaki çok merkezli IgA kohortunu içeren VALIGA çalışması ile MEST skorunun korelasyon gösterdiği saptanmıştır. MEST skoru değerlendirmesi aşağıda belirtilen kriterlere uygun olarak yapılmaktadır (68).

M skoru

Mezanjiyal hiperselülarite gösteren glomerullar <% 50 ise 0

Mezanjiyal hiperselülarite gösteren glomeruller $> \% 50$ ise 1

E skoru

Endokapiller hiperselülarite yok ise 0

Endokapiller hiperselülarite var ise 1

S skoru

Segmental glomeruloskleroz yok ise 0

Segmental glomeruloskleroz var ise 1

T skoru

Tubuler atrofi/interstisyel fibrozis korteksin $< \% 25$ 'inde var veya hiç yoksa 0

Tubuler atrofi/interstisyel fibrozis korteksin $\% 25-50$ 'sinde var ise 1

Tubuler atrofi/interstisyel fibrozis korteksin $> \% 50$ 'sinde var ise 2

2.5.1. İmmünohistoloji

Orijinal Oxford Sınıflamasında immünohistolojik bulgular analiz edilmemiştir. IgAN'daki glomerular birikimler tipik olarak mezanjiyal dağılım gösterir. Ancak hastaların üçte birinde subendotelyal kapiller duvarda IgA birikimlerinin olduğu, daha az sayıda hastada da glomerular IgG birikimlerinin olduğu gösterilmiştir (69). Subendotelyal kapiller duvarlarında IgA ve glomeruler IgG'nin varlığı mezanjiyal ve endokapiller hiperselülarite ile uyum göstermektedir. Genel olarak MEST kriterleri, IgAN'de prognostik belirteçtir. Ancak Oxford Sınıflamasında bulunmamasına rağmen immünohistolojik bulguların da biyopsi raporunda (IgG ve IgA birikimlerinin varlığı ve dağılımının) belirtilmesi önerilmektedir (70).

2.5.2. Glomerular Kresent

Oxford sınıflamasında yer almayan bir diğer bulgu da glomerular kresentlerdir. Oxford sınıflamasındaki hasta grubunda yeterli kresent sayısı olmaması nedeniyle sınıflamaya dahil edilmemiş, ancak daha sonraki yazılarda kresent varlığının prognoza etki eden önemli bir histopatolojik bulgu olduğu gösterilmiştir. Tek değişkenli analizlerin yapıldığı birçok çalışma, kresentlerin klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu belirlerken, çok değişkenli analizler kresentlerin prognostik öneminin de olduğunu gösterilmiştir (71).

2.6. COSMC

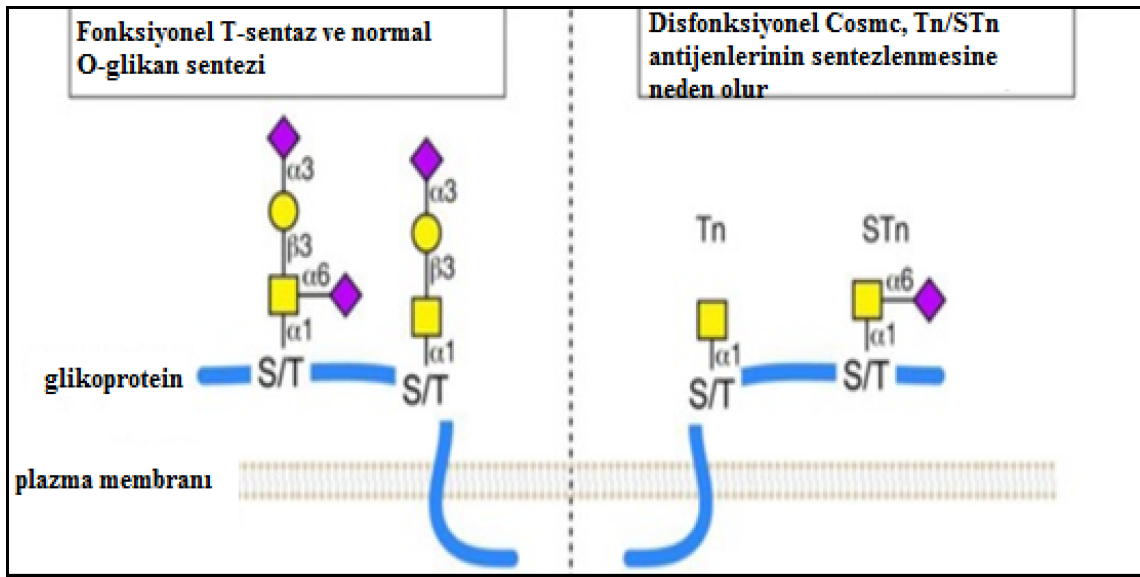
Glikoproteinlerin yapısında bulunan O-glikanların sentezinde birçok glikoziltransferaz enzimi görev almaktadır. C1GalT1 enzimi, tüm dokularda bulunan T antijenlerinin (O-glikanların öncüsü) sentezlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. C1GalT1, endoplazmik retikulumda sentezlenir ve golgi aygıtında O-glikanların sentezine katılır. C1GalT1 enzimlerinin ekspresyonu için COSMC (C1GalT1C1) gereklidir. COSMC, endoplazmik retikulum (ER)'da bulunan moleküler bir şaperondur (72).

COSMC yeni sentez edilmiş C1GalT1 ile etkileşime geçerek, bu enzimin kümeleşmesini ve bunu izleyen proteozomal parçalanmayı engelleyerek, bu molekülün aktif formunun oluşmasını sağlar. Bu nedenle C1GalT1 sentezi için COSMC'in eş zamanlı biyosentezi gereklidir (73-77).

COSMC, ER'de yeni sentezlenmiş C1GalT1'in N-terminal bölgesinde bulunan hidrofobik bölgeye (CBRT) direkt olarak bağlanır (78,79). Bu bağlanma, C1GalT1'in katlanmasını arttırarak fonksiyonel yapısını kazanmasını sağlar (80).

COSMC ile C1GalT1'in hidrofobik bölgesinin etkileşimi heterokompleks bir yapı oluşturur. Bu kompleks C1GalT1 peptidinin doğru katlanmasını sağlar. C1GalT1 fonksiyonel yapısını kazanınca COSMC kompleksten ayrılır. Serbest kalan hidrofobik dizi proteinin içine doğru gömülebilir veya C1GalT1'in homodimerizasyonuna yardımcı olabilir. Bu da, dimerik C1GalT1 arasında homodimerik hidrofobik arayüz oluşturur. Katlanması tamamlanan ve aktif forma geçen C1GalT1 daha sonra O-glikozilasyona katılmak üzere golgi aparatına gönderilir. Bununla birlikte, fonksiyonel COSMC'den yoksun hücrelerde, yeni sentezlenen C1GalT1, Big (Bağlayıcı protein: endoplazmik retikulumda bulunan ve 78-kDa glikozla düzenlenmiş protein olarak da bilinen büyük şaperon) gibi diğer moleküler şaperonlara bağlanır ve yanlış katlanmalar yapar (81). Yanlış katlanmış C1GalT1, ER'den sitoplazmaya taşınır, daha sonra ubiquitinlenir ve 26S proteazom ile parçalanır (73) (Şekil 2-11).

dönemde insan COSMC ve C1GalT1 genleri henüz klonlanmamış olduğundan, onlar için bu kritik genlerin metilasyon durumunu test etmek mümkün olmamıştır (89). Son yıllarda yapılan çalışmalarda COSMC ekspresyonunun regülasyonu tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte COSMC geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu ile genin epigenetik olarak susturulduğu ve böylece COSMC ekspresyonunun azaldığı düşünülmektedir (96). Bunun sonucunda aktif olmayan bir C1GalT1 oluştuğu ve böylece O-glikanları olmayan Tn ve sTn antijenlerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (82).



Şekil 2-12: COSMC ve O-glikan sentezi

2.7. Gen Ekspresyonunun Regülasyonu

Gen ekspresyonu, Ribo Nükleik Asit (RNA) polimeraz ve Transkripsiyon Faktörlerinin (TF) bağlanabildiği açık kromatin yapısındaki promoterlere sahip genlerde gerçekleşir. Promoter; gen transkripsiyonunu başlatması için 5' uca RNA polimerazın bağlandığı spesifik Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) dizisini ifade eder. İlk kez Escherichia coli genomundan izole edilmiştir. Genellikle genin başlangıç noktasının yukarı yönünde yer alsa da aşağı yönde ya da gen içinde yer alan promoterler tanımlanmıştır. RNA polimeraz, promoter bölgesinde yer alan bazı dizilere (-80 CAAT ve -30 TATA) karşı yüksek afinite gösterir. RNA polimerazın promoterü tanıyıp DNA'ya bağlanması, transkripsiyonun uygun yerden (+1; başlangıç noktası) başlamasını sağlar. Transkripsiyonun başlayabilmesi için, TF'lerinin genin promoter bölgesindeki CG (C: Sitozin, G: Guanin)'den zengin dizilere bağlanması gerekir. İnsan

genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CG dizisi bulunmaktadır. Bu dizilerin %10'dan azı, CpG adacıkları olarak adlandırılan 500 bç'den büyük ve CG içeriğinin %55'den fazla olduğu bölgelerde bulunmaktadır. "p", C ve G'nin bir fosfodiester bağ ile bağlandığını gösterir. Evrimsel süreçte korunmuş olan CpG adacıkları, genellikle genlerin promoter bölgelerinde yerleşim göstermektedir (97-100).

Kromatin yapısı, yapısal ve kimyasal birtakım değişimlere uğrayarak gen ifadelerini etkilemektedir. Kromatin yapısı sıkılaşp yoğunlaştığında (heterokromatin) genler inaktif (sessiz) olur, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (ökromatin) ise genler aktif olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu değişiklikler epigenetik mekanizmalar ile düzenlenir (101). Kromatin yapısı, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (102).

2.8. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik terimi ilk olarak 1950'li yıllarda Conrad Waddington tarafından önerilmiştir (103). Waddington, bu terimi "fenotipi meydana getiren genler ve onların ürünleri arasındaki nedensel etkileşimler" olarak tanımlamıştır. Epigenetik, "gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin primer DNA dizisinden bağımsız olarak incelenmesi" olarak kabul edilir. Epigenetik düzenleme, DNA'nın nükleotid yapısında değişikliğe yol açmadan mitoz ve/veya mayoz bölünmeyle aktarılabilen, genlerin ne zaman, nerede ve ne kadar aktif olacağını belirlemektedir. Epigenetik modifikasyonlar çevresel faktörlerden etkilenirler (104).

Epigenetik mekanizmaların birbiriyle uyum içinde etkileşmesi ve düzenlenmesi, normal bir embriyonik gelişim için çok önemlidir. Bu süreçte, aynı genetik diziye sahip hücreler, farklı ekspresyon profilleri sergileyerek değişik fenotipler gösterirler. Bir organizmada tek bir atasal hücreden çok farklı hücre tipinin oluşması, genlerin farklı yer ve zamanlarda eksprese olmalarından kaynaklanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, belirli genlerin eksprese olmasını sağlarken belirli genlerin ekspresyonunu baskılamaktadır (100). Bu mekanizmaların herhangi birindeki bir hata ya da düzensizlik, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olmaktadır (101).

Epigenetik değişiklikler, genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşümlü bir olaydır (106). DNA ve kromatinde meydana gelen modifikasyonlar,

transkripsiyonu aktive eden veya baskılayan moleküllerin aktivitelerini düzenlemektedir. Kromatinin yapı, işlev ve gen ekspresyon paternini belirleyen epigenetik mekanizmalar tanımlanmıştır. Transkripsiyon sonrası histon modifikasyonları, histon varyantları, kromatin yeniden şekillendirme kompleksleri, kodlamayan RNA ve DNA metilasyonu gibi çeşitli moleküler mekanizmaları kapsamaktadır (97,104,105).

2.8.1. Kovalent Histon Modifikasyonları

Vincent Allfrey 1960'lı yılların başında histonların postranslasyonel olarak değiştirildiğini bildirdi (107). Günümüzde histonların çok sayıda farklı posttranslasyonel modifikasyonları (PTM) olduğu bilinmektedir. Histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan dışarı doğru kuyruk şeklinde çıkıntı yaparak komşu nükleozomlarla temas eder. Histon proteinlerinin kuyruk modifikasyonu nükleozomlar arası teması etkiler ve genel kromatin yapısını değiştirebilir. Bu modifikasyonlar sadece kromatin yapısını düzenlemez, aynı zamanda nükleozomları yeniden konumlandırmak için Adenozin Trifosfat (ATP)'ın hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak yeniden şekillendirme enzimlerini de toplar. (108).

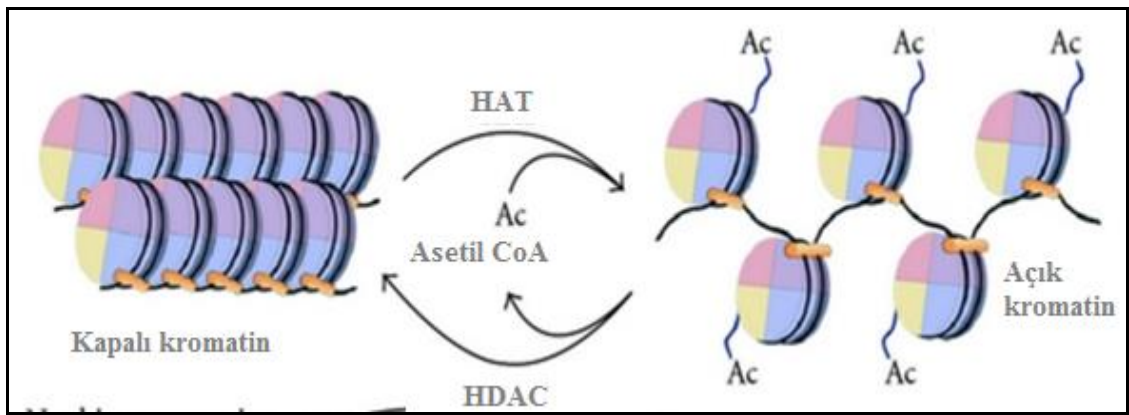
Histon modifikasyonları transkripsiyonu etkileyebileceği gibi onarım, replikasyon ve rekombinasyon gibi diğer süreçleri de etkileyebilmektedir (105).

Histonların N-terminal uçlarında oluşan kovalent PTM'ler, epigenetik mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bu mekanizmaların başlıcaları asetilasyon/deasetilasyon, fosforilasyon, ubikuitinasyon/sumolasyon, β -N-asetilglukozamin eklenmesi, Adenozin difosfat (ADP)-ribozilasyonu ve metilasyondur (105).

2.8.1.1. Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu;

Allfrey ve ark. (107) 1964 yılında histon asetilasyonunu tanımlamıştır. Histonların lizin (K) aminoasitlerinde meydana gelen asetilasyonun, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim ailelerinin zıt hareketleri sayesinde oldukça dinamik olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu enzimler arasında birçok transkripsiyon düzenleyicileri ile etkileşime girebilen CBP (CREB (cAMP duyarlı eleman bağlama proteini) binding protein-CREBBP) ve p300 (adenovirus E1A-iliskilendirilmiş 300-kD protein) en önemlileridir (109).

Histon asetiltransferazlar, asetil CoA'yı kofaktör olarak kullanarak bir asetil grubunu lizin yan zincirlerinin ϵ -amino grubuna transfer eder. Histon proteinlerinin amino ucundaki lizin kalıntıların asetilasyonu, pozitif yükleri kaldırarak histon ve DNA arasındaki afiniteyi azaltır, kromatin yapısının açılmasına neden olur. Aynı şekilde deasetilasyon histon ve DNA arasındaki afiniteyi artıracığı için kromatinin daha sıkı paketlenmesini sağlayarak kapalı kromatin oluşumuna neden olmaktadır. Histon asetilasyonu, RNA polimeraz ve TF'lerinin promotor bölgeye daha kolay ulaşmasını sağlar. Bu nedenle çoğu durumda, histon asetillenmesi transkripsiyonu arttırırken, histon deasetilasyonu transkripsiyonunun azalmasına neden olur (Şekil 2-13) (110).



Şekil 2-13: Histon asetilasyonu/deasetilasyonu

Asetilasyonunun görüldüğü histon ve aminoasitler,

H2A histonunda, lizin 5 (H2AK5Ac) ve lizin 9 (H2AK9Ac) (Ac: Asetilasyon)

H2B histonunda lizin 5 (H2BK5Ac), lizin 12 (H2BK12Ac), lizin 20 (H2BK20Ac), lizin 24 (H2BK24Ac)

H3 histonunda lizin 9 (H3K9Ac), lizin 14 (H3K14Ac), lizin 18 (H3K18Ac), lizin 23 (H3K23Ac), lizin 27 (H3K27Ac)

H4 histonunda lizin 3 (H4K3Ac), lizin 5 (H4K5Ac), lizin 8 (H4K8Ac), lizin 12 (H4K12Ac), lizin 16 (H4K16Ac), lizin 20 (H4K20Ac)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HAT ve HDAC enzimlerinin histonlar üzerine etkisi araştırılmıştır. Ancak son çalışmalar, histon modifiye edici enzimlerin non-histon proteinler üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir (111,112).

2.8.1.2. Fosforilasyon:

Fosforilasyon sadece histon H3'ün amino terminal histon kuyruklarında bulunan Ser, Thr ve tirozin kalıntılarında gerçekleşir. Kinazlar ve fosfatazlar tarafından kontrol edilir (113). H3'ün 10. pozisyonundaki Serin'in fosforillenmesi, kromozom kondensasyonunun başlatılması için gerekli olduğu bilinmektedir (114,115).

2.8.1.3. Ubikuitinasyon ve Sumolasyon:

Ubikuitin, E1-aktive edici, E2-konjüge edici ve E3-bağlayıcı enzim olmak üzere üç enzimin sıralı etkisi ile histon lizinine bağlanan 76 aminoasitlik bir polipeptittir (116). Histon ubikuitinasyonunun gerçekleştiği iki bölge (H2A ve H2B) belirlenmiştir. H2AK119ub1 gen sessizleştirmesinde, H2BK123ub1 transkripsiyonun başlama ve uzamasında önemli bir rol oynamaktadır (117-119). Sumolasyonda, küçük ubikuitin benzeri modifiye bir molekül (SUMO) rol alır. Bu molekül histon lizin rezidülerine kovalent olarak bağlanır ve azalan gen ifadesi ile ilişkilendirilmiştir (120).

2.8.1.4. Adenozin Difostat (ADP) Ribozilasyonu;

Histonların, glutamat ve arginin kalıntıları üzerinde ribozilatlanmış mono- ve poli-ADP olduğu bilinmekle birlikte, bu modifikasyonun işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir (121). Negatif yüklü poli-ADP-riboz zincirinin, DNA ile histonlar arasındaki etkileşimi azaltarak, kromatinde bölgesel açılmalara neden olduğu düşünülmektedir (122).

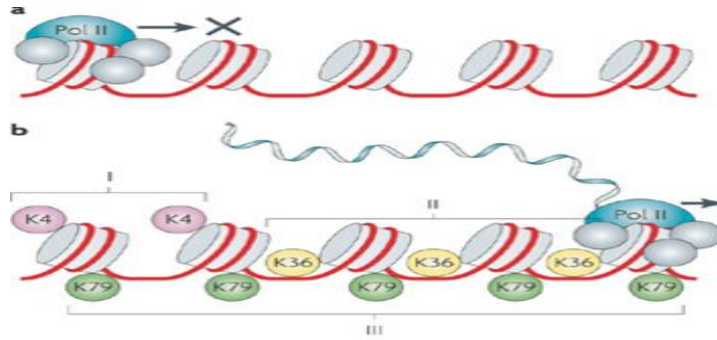
2.8.1.5. β -N-asetilglukozamin

Birçok non-histon proteinlerin Ser ve Thr yan zincirleri, β -N-asetilglukozamin (O-GlcNAc) şeker rezidüleri ile modifiye edildiği, ayrıca H2A, H2B ve H4 histonlarının O-GlcNAc tarafından modifiye edildiği gösterilmiş olmakla birlikte işlevi hakkında henüz net bir bilgi bulunmamaktadır (123).

2.8.1.6. Histon Metilasyon:

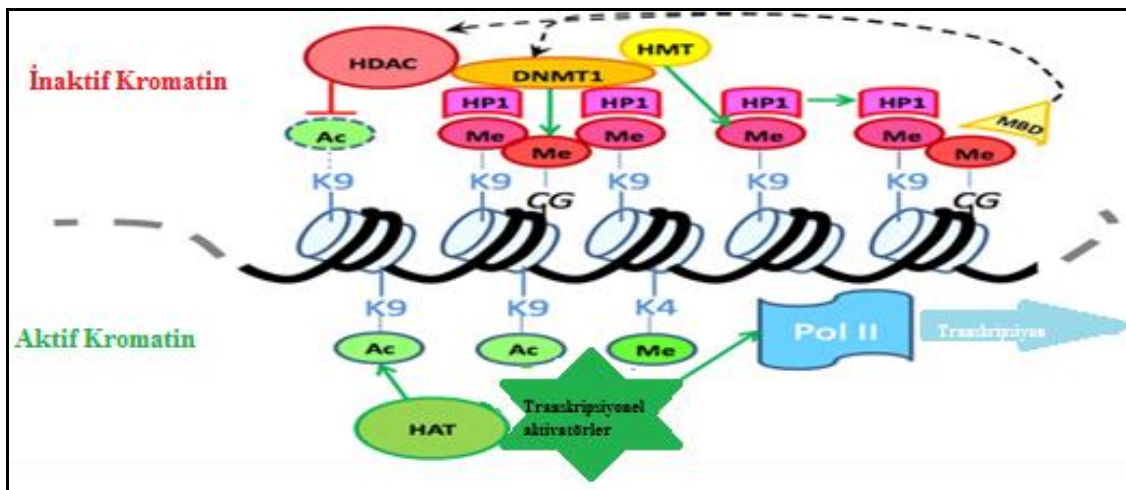
Histonlarda K ve Arjininin (R) aminoasitlerinin azot atomlarında post-translasyonel olarak gerçekleşen kovalent bir modifikasyondur. Histon metiltransferaz (HMT) ve Histon demetilaz (HDM) enzimleri aktiftir. Histon metilasyonu, olduğu bölgelere bağlı olarak transkripsiyonunun baskılanması veya aktivasyonuna neden olabilir. HMT, kromatin bağımlı transkripsiyonun baskılanması veya aktivasyonu yoluyla DNA metilasyonunu kontrol eder veya düzenler. RNA polimeraz II, genin

promoter bölgesine bağlanır, ancak histon çekirdeği üzerinde spesifik metilasyon işaretleri olmadan transkripsiyonu ilerletemez. Bir promoter bölgedeki, histon H3 lizin 4 metilasyonu (H3K4me), H3K36me veya H3K79me işaretleri taşıyorsa, promoter açık okuma çerçevesine sahip demektir ve bu RNA transkripsiyonu başlatılabilir (Şekil 2-14) (124).



Şekil 2-14: Histon metilasyonu

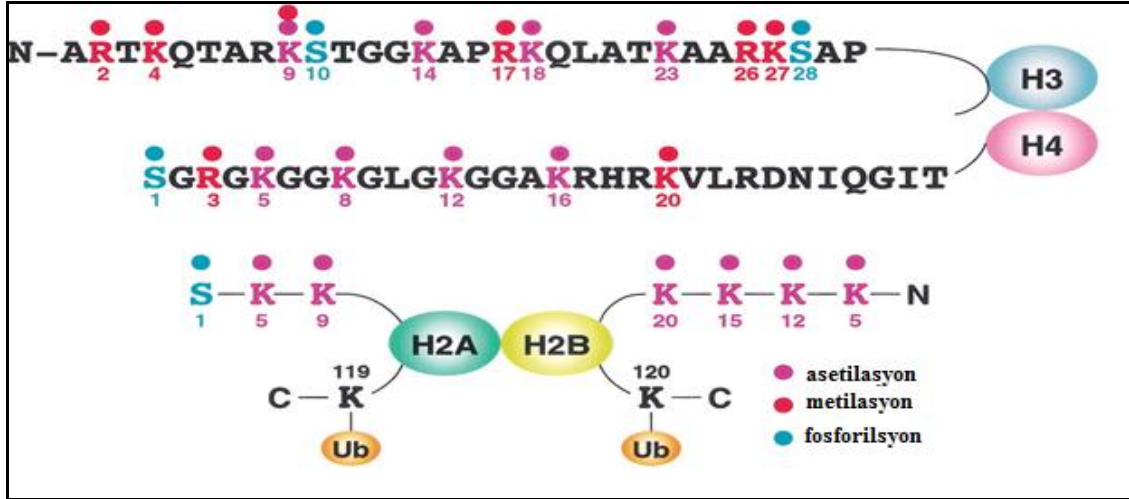
Bir promoter, H3K9me3, H3K14me3, H3K23me, H3K27me3, H3R2me, H3R17me, H3R26me, H4R3me işaretleri taşıyorsa promoter açık okuma çerçevesine sahip değildir dolayısıyla da genin ifadesi susturulmuştur. Histon kuyruklarında metilasyonun meydana geldiği pozisyon ve miktarı (mono-, di-, tri-) çok önemlidir ve genin ifadesini doğrudan etkiler (125). Heterokromatin protein 1 (HP1), H3K9me3'ü tanır ve susturma sinyalinin yayılmasına yardımcı olan HMT, DNA metil transferazlar (DNMT) ve metil sitozinine bağlanan proteinleri (MBD) ile etkileşir. Bu etkileşim heterokromatin yapıyı ilerleterek transkripsiyonu baskılar (Şekil 2-15) (126).



Şekil 2-15: Epigenetik regülasyon

Lizin metilasyonu; transkripsiyon aktivasyonu boyunca nükleozom değişikliklerini sağlayan nükleozom yeniden şekillendirme kompleksi [SWI/SNF-(The mating-type switching /Sucrose Non Fermenting)]'nin aktivasyonuna da neden olur (127).

Histonların N-terminal uçlarında meydana gelen yaygın kovalent PTM'ler ve pozisyonları Şekil 2-16'da gösterilmektedir (128).



Şekil 2-16: Histonlarda yaygın olarak meydana gelen modifikasyonlar

2.8.2. Kovalent Olmayan Mekanizmalar

2.8.2.1. Nükleozom Yeniden Şekillendirme

Nükleozom yeniden şekillendirme kompleksleri, DNA ve histon arasındaki etkileşimi değiştirerek TF'lerinin DNA düzenleyici elemanlarına bağlanmasını sağlamaktadırlar. Bu komplekslerin SWI/SNF ailesi, ilk olarak maya genlerindeki mutasyon çalışmalarında keşfedildi. İnsanda SWI/SNF analogları, BRG (Brahma ilişkili gen)-1 ilişkili faktör (BAF) ve PBAF (Polybromo, BRG1-associated factor) bileşikleridir. RSC (Remodelling the Structure of Chromatin) ailesi SWI/SNF ile ilişkili diğer bir kromatin değiştirici kompleksdir. Her aile özel altbirim kompozisyonuna sahiptir ve ayrı bir ATPaz içermektedir (129). Kromatin yeniden şekillendirme kompleksleri, DNA'yı nükleozomun etrafına kaydırmak için ATP hidroliz enerjisini kullanırlar. Bunlar nükleozomların yapısını ve düzenlenmesini histonları uzaklaştırmadan veya kovalent olarak modifiye etmeden değiştiren protein kompleksleridir (127).

Nükleozom yeniden biçimlendirme komplekslerinin iki farklı etki mekanizması vardır (101).

1. Histon oktomerlerinin DNA molekülleri üzerinde kaymasını katalizleyerek nükleozomların yer değiştirmesini sağlar. Böylece TF'leri spesifik dizilerine ulaşabilir ve bağlanabilir.
2. Nükleozom konfirmasyonunun değişimine neden olarak, spesifik DNA dizilerinin transkripsiyon düzenleyen proteinleri ile etkileşimini sağlayabilir.

Nükleozom yeniden biçimlendirme kompleksleri, transkripsiyonu aktive edici ya da baskılayıcı moleküller ile birlikte DNA'ya bağlanıp nükleozom düzenini değiştirerek transkripsiyonu uyarabilir veya engelleyebilir (101).

2.8.2.2. Histon Varyantları:

Son yıllarda histon varyantlarının, ökaryotik yaşamda epigenetik mekanizmalarda rol alan ana faktörlerden biri olduğu belirlenmiştir. Bilinen standart histon genleri, genomda kümeler halinde bulunur ve replikasyona bağımlı bir şekilde ifade edilir. Histon varyant genleri, alel içermez ve genellikle intron içerir. Replikasyondan bağımsız olarak hücre döngüsü boyunca ihtiyaç duyuldukça eksprese olabilmektedir. Protein seviyesinde kanonik ve varyant histonlar arasındaki farklar, birkaç aminoasitten büyük non-histon alanların eklenmesine kadar uzanır. Böylece nükleozom yapısı, stabilitesi ve PTM'lerin meydana gelmesi ile farklı etkileşimlerin oluşmasına izin verilmektedir (130). Bu farklılıklar nedeniyle histon varyantları transkripsiyon regülasyonu, hücre döngüsü kontrolü, kromozom stabilitesi ve DNA tamiri gibi birçok DNA bazlı hücresel sürece katkıda bulunmaktadır (131). Şimdiye kadar en iyi karakterize edilmiş insan/memeli varyantları H3.3, sentromerik CENP-A ve makro H2A ile H2A.Z'dir (132). Histon varyantları, transkripsiyonel regülasyondan genom istikrarına kadar değişen çok sayıda biyolojik süreci etkileyen kromatin yapı değişikliklerine neden olabilir (133).

2.8.3. Kodlamayan RNA Aracılı Gen Susturulması

Kodlamayan RNA (non-coding)'lar, fonksiyonel proteinleri kodlamayan ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülen RNA'lardır. Son çalışmalar, miRNA'lar, piRNA'lar, endojen siRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'ların en yaygın düzenleyici RNA'lar olduğunu ve epigenetik kontrolde de önemli rollerinin

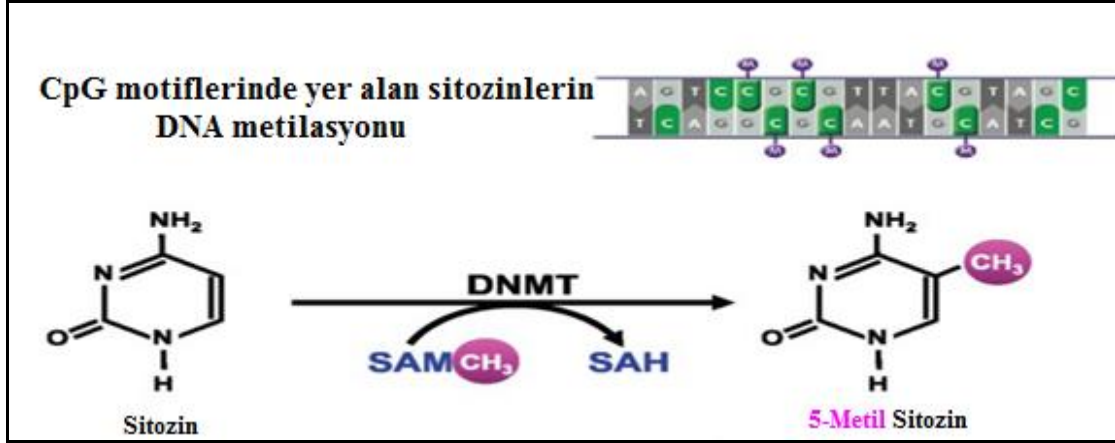
bulunduğunu göstermektedir. Promoter bölgelerinde CpG adacıklarını hedef alan kodlanmayan RNA, kromatin yoğunlaşmasına öncülük eden histon modifikasyonlarını tetikleyerek transkripsiyonu baskılar (101,134).

2.8.4. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, memelilerde bilinen tek DNA modifikasyonudur. Diğer modifikasyonlar DNA ile etkileşime giren proteinler ya da RNA interferans seviyesinde görülür. Kromatin, yapısal ve kimyasal birtakım değişimlere uğrayarak gen ifadelerini etkilemektedir. DNA metilasyonu, kromatin yapısını regüle ederek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. DNA metilasyonu, genomdaki C ve G çiftlerinin ardarda sıralanmasıyla oluşan CpG dizilerinin yoğunlaştığı bölgelerde gerçekleşmektedir. DNA metilasyonu, DNA'nın kendi kimyasal yapısının bir parçası olduğundan, diğer epigenetik işaretlerden daha karardır (135).

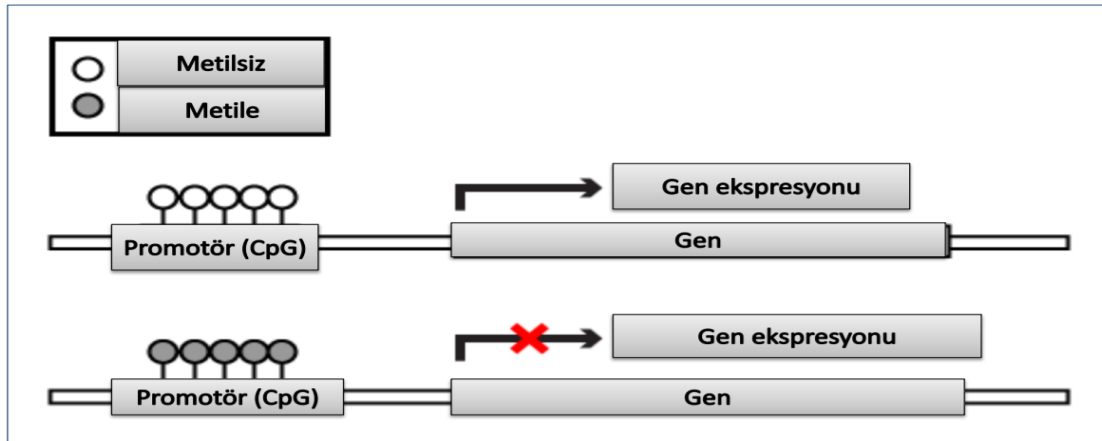
Genomda bulunan CpG dizilerinin tamamı metilasyona uğramaz. Farklı hücre tiplerinde farklı metilasyon modelleri görülmektedir. Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde C rezidülerinde metilasyon görülmektedir. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzimler, metil grubu vericisi olarak S-adenozil-L metiyonin (SAM)'den metil grubu alarak sitozinin 5. Karbonuna ekler (Şekil 2-17) (97). Memelilerde bilinen beş DNMT enzimi (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ve DNMT2) vardır. En önemli katalitik aktivitelere sahip olan enzimler DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'dir. Memeli DNMT1 enzimi, DNA'daki hemimetile bölgelere karşı yüksek afiniteye sahip olmasına karşı metile olmamış bölgelerde de novo metilasyona neden olabilmektedir. DNA zincirinde kurulu olan metilasyon desenlerinin yeni zincirlere aktarılmasından bu enzim sorumludur (136,137). DNMT1, ilk kez kolon kanserlerinde bildirilmiş olup, artan ekspresyon miktarından dolayı DNA metilasyon profilini değıştirdiğı gösterilmiştir. DNMT3A ve DNMT3B de novo metil transferazlar olarak adlandırılırlar ve gelişimin erken evrelerinde ilk metilasyon desenlerinin oluşturulmasından sorumludurlar (100). DNA metilasyonu geri dönüşümlü bir mekanizma ile çalışır yani dinamik bir modifikasyondur. Fizyolojik ve çevresel koşullara bağılı olarak DNMT'lar sitozine metil grubunu eklerken, demetilaz enzimleri uzaklaştırabilir fakat bu mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir (135).

Organizmanın gelişimi ve sağ kalımı için sürekli ifade edilmesi gereken yapısal ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları, DNA metilasyonuna karşı dirençli bölgelerdir. Bunun yanında, tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG dizilerinde, DNA metilasyon oranı yüksektir. Bu bölgelerin metillenmiş durumda olması ile transkripsiyon baskılanmakta ve bu elementlerin genom içi hareketi engellenerek kromozomun kararlı yapıda kalması sağlanmaktadır (97,98).



Şekil 2-17: DNA metilasyonu

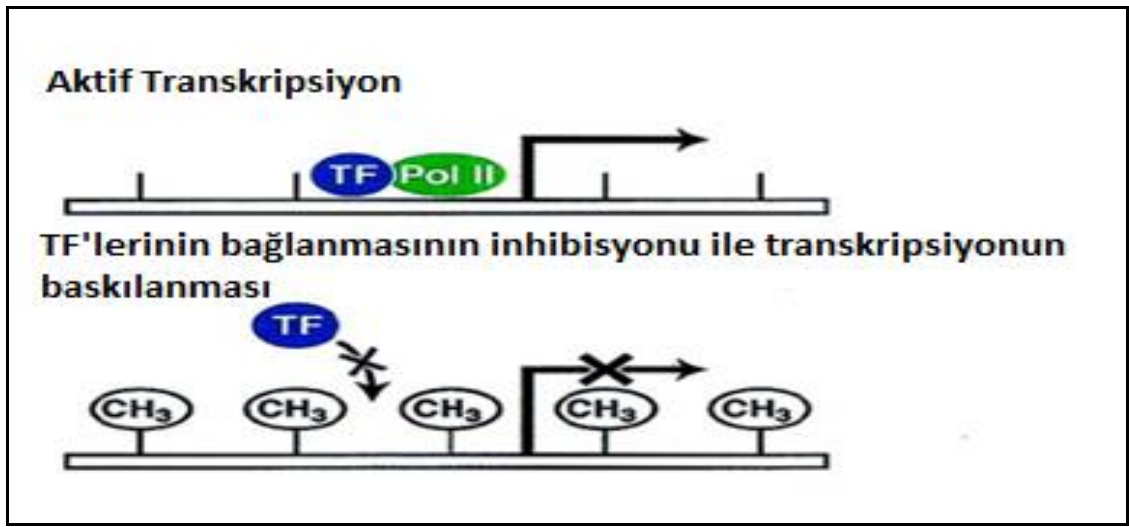
Sitozine metil grubunun eklenmesi ile DNA’da oluşan “epigenetik işaret”, genlerin hangi hücrede ifade olup hangi hücrede ifade olmayacağını belirlemektedir. İlgili genin promoter bölgesindeki CpG adacıklarının metillenmesi o genin transkripsiyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (Şekil 2-18) (140). CpG adacıkları normalde; işaretlenmiş (imprint) genler, kadınlarda X kromozom genleri, eşey hücrelerine özgü genler ve dokuya özgü genler olmak üzere 4 durumda metiledir (141). DNA metilasyonu, iki ana mekanizma ile gen ekspresyonunu baskılamaktadır.



Şekil 2-18: Promotör bölgenin metilasyonu ve ekspresyon durumu

2.8.4.1. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında Direk Mekanizma:

Direk mekanizmalarda, genin promoter bölgesine TF'lerinin bağlanmasının fiziksel olarak engellenmesi söz konusudur. TF bağlanma bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, TF'lerin bağlanmasını yapısal olarak engeller ve gen ifadesi baskılanır. AP-2, c-myc/ myn, cAMP-bağımlı aktivatör CREB, E2F ve NF-kB gibi TF'lerinin tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG rezidüleri içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyondan dolayı TF'leri bağlanmadığından transkripsiyon inhibe olur (Şekil 2-19) (142).



Şekil 2-19: DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonun baskılanmasında direk mekanizma

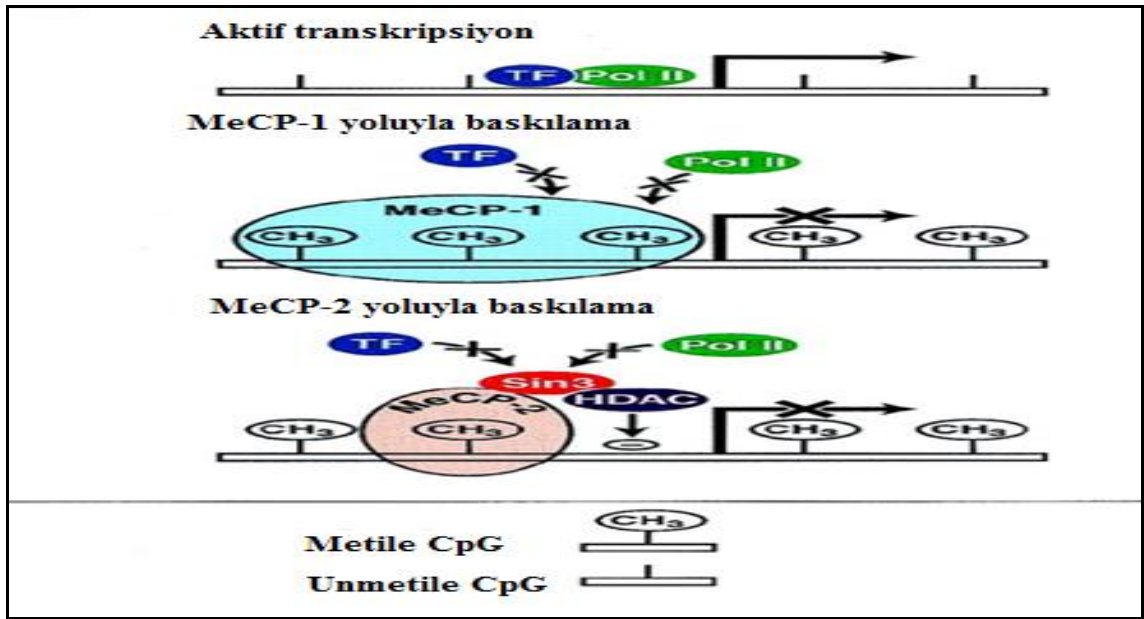
2.8.4.2. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında İndirek Mekanizma:

İndirek mekanizmalarda, genin promoter bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, metile sitozin bağlanma proteinleri (MeCP) olarak adlandırılan birtakım faktörlerin bu bölgeye bağlanmasını tetiklemektedir. MeCP-1 ve MeCP-2, herhangi bir dizide metillenmiş CpG rezidülerine bağlanarak inaktivasyona neden olur (50). MeCP-1, çok sayıda metillenmiş CpG bölgelerine bağlanır, TF'lerinin ve RNA polimerazın promotere bağlanmasını engeller (143).

MeCP-2, hücrede MeCP-1'den daha bol miktarda bulunur ve tek bir metillenmiş CpG çifti içeren DNA'ya bağlanabilmektedir. MeCP2, metil-CpG bağlanma domaini (MBD) ve transkripsiyon baskılayan domainine (TRD) sahiptir. MeCP-2'nin bağlanması, HDAC ve HMT gibi birçok korepresör proteinin de bölgeye gelmesini

sağlamaktadır. HDAC'ler, bu bölgedeki histonları deasetile eder ve böylece kromatin yapısı inaktif konfigürasyon kazanır. SUV39 gibi HMT'lar ise H3K9'u metiller ve inaktif kromatin yapısını daha da sağlamlaştırır.

H3K9 metilasyonu aynı zamanda HP1 ve kromatin yeniden şekillendirici proteinleri (BRM, SIN3A) de bu bölgeye çeker. Sonuçta, genin promoter bölgesinde oluşan bu kompleks genin transkribe olmasını engeller ve gen ifadesi baskılanır (Şekil 2-20) (142,144-146).



Şekil 2-20: DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanmasında İndirek mekanizma

Transkripsiyon, eş zamanlı olarak DNA demetilasyonu, histon asetilasyonu, pozisyona bağlı olarak histonda meydana gelen modifikasyonlar (fosforilasyon, ubikuitinasyon, sumolasyon ve metilasyon) ve kromatin yeniden şekillendirici protein kompleksleri aracılığıyla kromatinin yapı olarak açık hale gelmesi ile gerçekleşebilir. Transkripsiyon faktörleri ve RNA Polimeraz ekspresyonu gerçekleşecek olan hedef proteinin promoterüne ulaşabilir ve transkripsiyonu başlatabilirler. DNA, nükleozom yapısıyla sıkı bir şekilde paketlenmiş yani yoğun kromatin yapısında iken transkripsiyon gerçekleşmemektedir (101,102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hasta grubu

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı ve Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Bilim Dalına Ocak ve Ağustos 2016 tarihleri arasında başvurmuş biyopsi ile IgAN tanısı almış ve henüz tedaviye başlamamış yetişkin 30 hasta, kontrol grubuna hastalarla birinci derece akrabalık ilişkisi olan 11 kişi ve hastalarla hiçbir ilişkisi olmayan 6 sağlıklı kişi dahil edildi. Hastalardan ve hastaların birinci derece yakınlarından Nefroloji polikliniğinde, hastalarla ilişkisi olmayan sağlıklı kişilerden ise Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 15 cc Lityum (Li) heparinli ve 5 cc kuru tüpe kan alındı. Hastaların laboratuvar analizleri İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Bu çalışma için İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan Etik Kurul raporu (2015-1506) alındı.

3.2. Değerlendirme için uygulanan işlemler

1. Periferik kan mononükleer hücre (PBMC) izolasyonu
2. B lenfosit izolasyonu
3. B hücre kültürü
4. B lenfositlerden DNA izolasyonu
5. B lenfositlerden RNA izolasyonu
6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi
7. Gerçek Zamanlı (Real-time) Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT PZR) ile COSMC mRNA ekspresyon düzey tayini
8. RT-PCR ile COSMC geni promoter bölgesinin metilasyon düzey tayini
9. Hücre kültür süpernatantında ve serumda GdIgA1 düzeyinin ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile ölçülmesi

3.2.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Li-heparinli tüpe alınmış olan kan örnekleri Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile 1:2 oranında dilue edildi. Herbir hasta için 5 adet 15 cc'lik falkon tüpüne 5ml Ficoll-Hypaque (FH) solüsyonu (Sigma) kondu ve dilue edilmiş olan kan örneği 5ml FH üzerine yavaşça yüklendi. Kanlar 2600 RPM devirde 20 dakika santrifüj edildi.

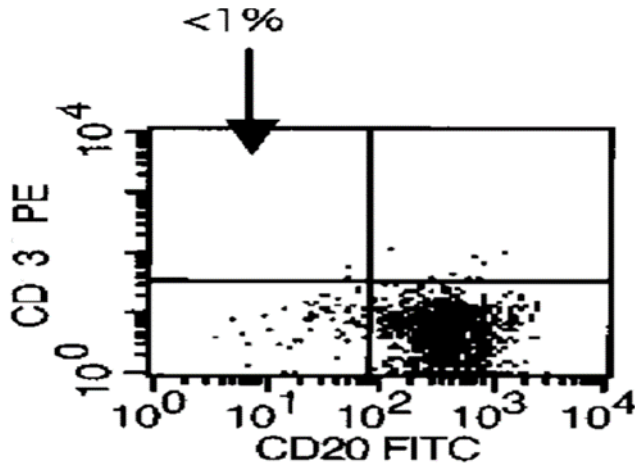
Mononükleer hücrelerden zengin bant (arayüzey-floopy) toplandı ve PBS ile iki kez yıkandı.

3.2.2. B Lenfosit izolasyonu

Periferik kan mononükleer hücrelerin içindeki B lenfositler magnetik partiküller kullanılarak ayrıldı (The EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit, StemCell) (148). Hücreler, 5 ml'lik tüp içinde RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640, Lonza) ve FCS (Fetal Buzağı Serum, Gibco) solüsyonu kullanılarak $3-5 \times 10^7$ hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanmış total hücre içine 50 µl/ml insan B hücre zenginleştirici kokteyli konuldu. Bu karışım oda ısısında (15-25°C) 10 dk inkübe edildi. Magnetik partiküller kulanmadan hemen önce agregat oluşturmaması için 30 saniye vortekslendi. Hücrelerin bulunduğu tüpe 75 µl/ml magnetik partiküllerden eklendi, iyice karıştırıldı ve oda ısında 5 dk inkübe edildi. Hücre süspansiyonuna total volüm 2,5 ml olacak şekilde medyum ilave edildi. Tüp içindeki hücre karışımı 2-3 kez aşağı yukarı hareketler ile / ters çevrilerek karıştırıldı. Tüp magnet içine kapaksız olarak yerleştirilip 5 dk bekletildi. Magnet içindeki tüp çevrilerek çalkalandı, yeni bir 5 ml'lik tüp içine hücreler döküldü. Manyetik olarak etiketlenmiş istenmeyen hücreler Magnet'in manyetik alanı tarafından düzenlenen orijinal tüp içinde bağlı kaldı. Magnet ve tüp 2-3 saniye ters pozisyonda bırakılıp sonra dik duruma tekrar getirildi. Yeni tüp içinde izole olan hücrelerin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile saflığı ölçüldü. Canlılığı tripan mavisi ile analiz edilen ve canlılık oranı % 85 ve üstü olan hücreler çalışmaya dahil edildi.

Akan Hücre Ölçer Yöntemiyle ile B lenfosit saflığının ölçülmesi

İzole edilen B lenfositlerinden 50 µl, CD20 FITC (Becton Dickinson) ve CD3 PE (Becton Dickinson) antikorlarından 3'er µl aynı tüpe konuldu. 3-5 saniye vorteks yapıldı. Oda ısısında 20 dk inkübe edildi. Daha sonra 1900 RPM'da 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpe 0,5 ml PBS konulup vortekslendi. Tüp Akan Hücre Ölçer cihazında (FasCalibur, BD) okutuldu. Saflığı %85 ve üssü olan hücreler kültüre edildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Akan Hücre Ölçer cihazında B hücrelerin görüntüsü

3.2.3. B Lenfosit Hücre Kültürü (149)

Kullanılan solüsyonlar:

- a. Kültür medyumunun hazırlanması:
 - 500 ml Glutaminli RPMI-1640 (Lonza)
 - 50 ml FCS (Gibco)
 - 10 µl Antibiyotik (Streptomisin/penisilin) (Gibco)
- b. 10 nanogram (ng)/ml İnsan- IL-4 (Reprokine) stok solüsyonunun hazırlanması
 - 10 mikrogram (µgr) liyofilize IL-4 + 1000µl distile su (10000 ng/ml stok)
 - ↓
 - 10 µl stok solüsyonu+ 990 µl distile su (100 ng/ml stok)
 - ↓
 - 1 ml hücre kültürü içine 100 µl (100 ng/ml) stok solüsyonundan konuldu (10 ng/ml).
- c. 20 mikromolar (µM) 5-Aza-2'-deoksitidin (AZA) (Sigma) stok solüsyonunun hazırlanması
 - 5 miligram (mg) AZA + 1,1 ml Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma) (20 milimolar (mM) stok)
 - ↓
 - 100 µl stok +900 µl PBS (2 mM stok)
 - ↓

100 µl stok +900 µl PBS (200 µM stok)



100 µl stok +900 µl PBS (20 µM stok)



1 ml hücre kültürü içine 50 µl (20 µM) stok solüsyonundan konuldu (1µmol/L).

AZA, DNA'nın demetilasyon veya hemi-demetilasyonunu neden olur. DNA demetilasyonu kromatin yapısını açarak gen ifadesini düzenler. Kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi, promoter bölgesine TF'lerinin bağlanmasına, transkripsiyon kompleksinin oluşmasına ve gen ekspresyonuna izin verir (149).

İzole edilen B lenfositler (yaklaşık 3×10^5 hücre/ml), 10% FCS, penisilin 100 Unite/ml, streptomisin 100 mg/ml içeren RPMI-1640 (Glutaminli) içinde ideal koşullar altında (37°C, %5 karbondioksit (CO₂), %95 hava) 3ml'lik steril tüpler içinde üç gruba ayrılarak 72 saat kültüre edildi.

Grup I: Herhangi bir uyararla muamele edilmemiş B lenfositler

Grup II: 10ng/ml IL-4 ile muamele edilen B lenfositler

Grup III: 1µmol/L AZA ile muamele edilen B lenfositler (Her 24 saatte bir medyumunu değiştirildi ve 1µmol/L AZA ilave edildi.)

3.2.4. B lenfositlerden DNA İzolasyonu

Her hasta için kültüre edilen üç gruptan ticari kit (The QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen) kullanılarak ayrı ayrı DNA izolasyonu yapıldı. DNA'ların spektrofotometre (Thermo, Nanodrop 2000c) ile yoğunluğu ölçüldü ve DNA konsantrasyonu 20-100 ng/ml olarak ayarlandı. Elde edilen DNA -20 °C'de saklandı.

3.2.5. B lenfositlerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, ticari kit (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen) kullanılarak yapıldı. Mikrosantrijüf tüplerine konulan B hücreleri parçalama solüsyonu (10 µl merkaptotanol + 350 µl parçalama solüsyonu) ile muamele edildi. Bu karışım genomik DNA eliminasyon spin kolon tüpüne aktarıldı. 4000 RPM'de 15 saniye santrifüj edildi. Spin kolon atılarak altta kalan kısma %70'lik ethanol ilave edildi. Bu karışım yeni bir spin kolona aktarıldı ve santrifüj edildi. Böylece RNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Spin kolon 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Spin kolona RNase free solüsyon konarak total RNA'nın alttaki epondorfta toplanması sağlandı.

Elde edilen RNA'nın spektrofotometrede yoğunluğu ölçüldü. A260:A280 oranı 1.8-2.0 ya da A260 da RNA konsantrasyonu >40 µg/ml olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Genomik DNA kontaminasyonu önlemek ve cDNA dönüşümünü sağlamak için ticari bir kit kullanıldı (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen).

DNA eliminasyon karışımı

RNA	25 ng–5 µg yoğunlukta olacak şekilde değişen miktarlar
Buffer GE	2 µl
RNase-free su	değişken
Total volum	10 µl

DNA eliminasyon karışımı 42°C de 5 dk PZR cihazında tutuldu ve hemen sonra 1 dk buz üzerine bekletildi.

Ters transkripsiyon karışımı

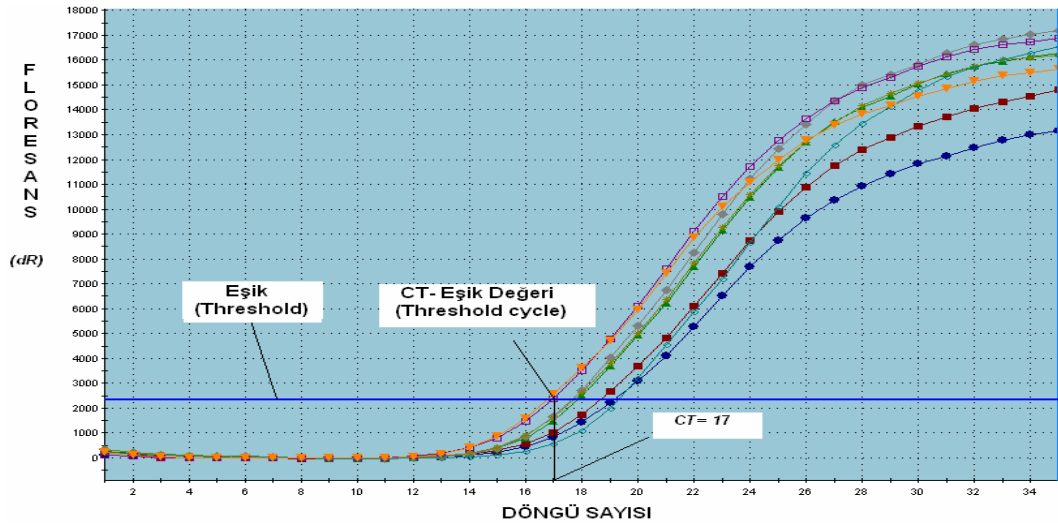
5x Buffer BC3	4 µl
Kontrol P2	1 µl
RE3 Ters Transkriptaz	2 µl
RNase-free su	3 µl
Total volum	10 µl

DNA eliminasyon karışımı bulunan tüpün içine 10 µl Ters transkripsiyon karışımı eklendi. Bu karışım 15 dk 42°C'de ve hemen sonra 5 dk 95°C'de inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı. 91 µl RNase-free su eklenip elde edilen cDNA değerlendirilecekleri güne kadar -20 °C de saklandı.

3.2.7. Gerçek Zamanlı (Real-time) Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile COSMC mRNA ekspresyon düzey tayini

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile bir gene özgün mRNA'nın incelenmesi ve böylece genin hücre içindeki ekspresyon miktarı ile o genin aktivasyonu hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar. RT-PZR sisteminin temelini floresan moleküllerin ışınlamalarının tespiti ve miktarının belirlenmesi oluşturur. Her bir PZR döngüsünde floresan ışınının kaydedilmesi ile başlağıçtan itibaren üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı olarak izlenir. PZR ürünlerinde ilk

anlamalı artışın olduğu noktaya eşik değer (threshold cycle-Ct) adı verilir (Şekil 3-2). Ct değeri gen ekspresyonunun kantifikasyonu açısından önemli bir parametredir (150).



Şekil 3-2: Amplifikasyon eğrisinde CT değerinin gösterilmesi

COSMC gen primerleri (Primer Assay Qiagen) (149)

F, 5-ATGGAATAGAATGCACCAC-3

R, 5-TTGGTCCAAGTCTCCTTTA-3

qRT-PCR Koşulları:

2X SYBR Green karışımı	12,5 µl
F primer (10 pikomol (pmol)/ µl)	0,5 µl
R primer (10pmol/ µl)	0,5 µl
cDNA	1 µl
RNase free su	10,5 µl
Toplam:	25 µl

25µl RT-PCR reaksiyonu Rotor-Gene-Q (Qiagen) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Şekil 3-3).

PCR programı

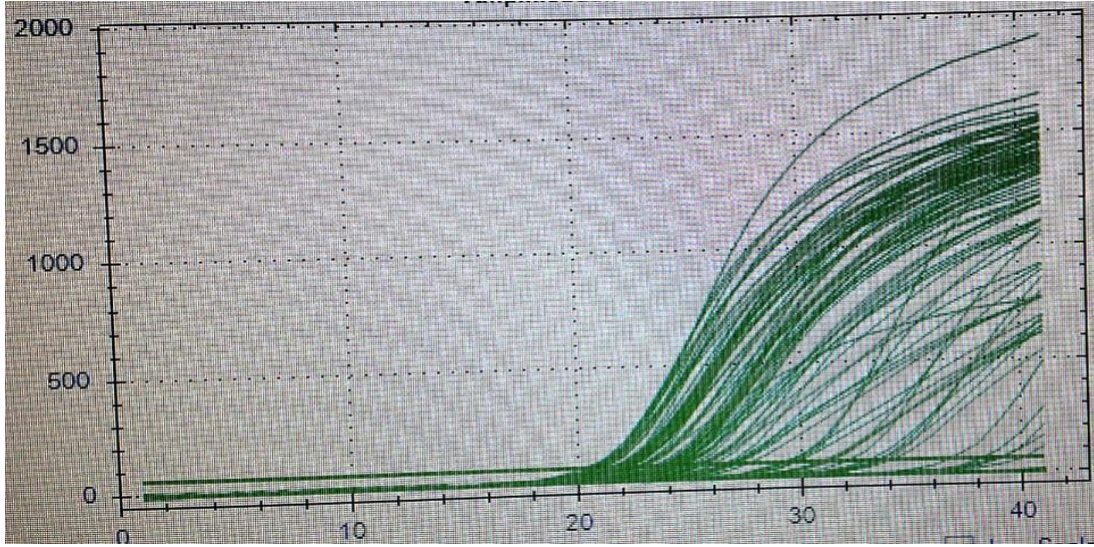
– 10“	95°C	1 siklus
– 15“	95°C	} 40 siklus
– 30“	60°C	

İnternal kontrol olarak Gliseraldehit-3-fosfatdehidrogenaz (GAPDH) geni kullanıldı.

GAPDH gen spesifik primerler (Qiagen):

F, 5'-CATTAAGGAGAAGCTGTGCT-3'

R, 5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3'



Şekil 3-3: Hasta örneklerinin Gerçek zamanlı PZR görüntüsü

Testin değerlendirilmesi:

Sonuçlar, Qiagen RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 programı kullanılarak hesaplandı. Genin mRNA seviyeleri her bir örnek için GAPDH ile normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır (150).

$\Delta\Delta C_t$ Analizi

Kantitatif RT-PZR, çalışmalarında gerçek zamanlı verileri analiz etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir. Gerçek zamanlı verilerin analizi iki farklı yöntemle yapılabilir.

1. Mutlak kantitasyon

2. Bağıl (göreceli) (rölatif) kantitasyon.

Mutlak kantitasyon, PZR sinyalleri genellikle standart bir eğri ile ilişkilendirerek kopya sayısını belirler. Göreceli kantitasyon, hasta grubunun kontrol grubuna göre hedef genin transkript sayısındaki artma ya da azalmayı PZR sinyaline göre yorumlar. Eşik değeri (C_t) yöntemi, qRT-PCR deneylerinden elde edilen genin göreceli değişikliklerini analiz etmek için uygun bir yoldur. C_t , amplifikasyon eğrisi ve eşik çizgisi arasındaki birleşme noktasıdır. $\Delta\Delta C_t$ yöntemi, qRT-PCR deneyleri ile belirlenen gen ekspresyonunda göreceli değişiklikleri hesaplamak için kullanılır. Aşağıdaki form kullanılarak hesaplama yapılır. PZR'nin doğal yapısı nedeniyle (her döngüde ampikon 2 katına çıkar) katlı değişim, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak hesaplanır (150).

$$\Delta C_{t1} = C_t (\text{Hedef Gen hasta}) - C_t (\text{Referans Gen hasta})$$

$$\Delta C_{t2} = C_t (\text{Hedef Gen-kontrol}) - C_t (\text{Referans Gen-kontrol})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct1 (\text{Hasta}) - \Delta Ct2 (\text{kontrol})$$

$$\Delta \Delta Ct = (\text{COSMC Ct} - \text{GAPDH Ct}) \text{ Hasta} - (\text{COSMC Ct} - \text{GAPDH Ct}) \text{ Kontrol}$$

$$\text{Normalize edilmiş hedef gen ekspresyon seviyesi: } = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

3.2.8. RT-PZR ile COSMC geni promoter bölgesinin metilasyon düzey tayini (151)

Bu yöntemde metilasyona duyarlı ve / veya metilasyon bağımlı restriksiyon enzimi ile kesmeler yapıldı ve daha sonra kesilen DNA analiz edildi (EpiTect II DNA Methylation Enzyme Kit, Qiagen). Bu enzimler sırası ile metile edilmemiş ve metile edilmiş DNA'ları keser. Kesilme işlemi takiben, her bir enzim reaksiyonundan kalan DNA, genin promoteri bölgesine spesifik primerler kullanılarak, gerçek zamanlı PZR ile ölçüldü. Metile ya da metile olmamış DNA parçaları enzim konulmamış kontrolün $\Delta \Delta Ct$ kesim miktarı ile karşılaştırılarak analiz edildi.

Başlangıçta genomik DNA, mock (enzim yok), metilasyona duyarlı (MSRE), metilasyon bağımlı (MDRE) ve her ikisini kapsayan (MSRE ve MDRE) dört eşit kısımda endonükleaz restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesimden sonra, enzim reaksiyonları qPZR mastermiks ve primer ile doğrudan karıştırıldı ve Mock (Mo, enzim yok) ürünü, RT-PZR tespiti için başlangıç toplam DNA miktarını temsil eder. Metilasyon-duyarlı kesim(Ms), MSRE, metillenmemiş ve kısmen metile DNA kesimini ifade eder. Metilasyon bağımlı kesim (Md), MDRE, metile DNA'yı keser. Çift kesim (Msd) reaksiyonunda, her iki enzim de mevcuttur ve (metillenmiş ve metillenmemiş) tüm DNA moleküllerinin kesimini yapar.

Testin Prosedürü

1.Basamak: Enzimsiz reaksiyon karışımının hazırlanması

DNA (yoğunluğu 200 ng)	değişken
5X Restriksiyon Kesim Solüsyonu	13 µl
RNase/DNase free su	değişken
Toplam	60 µl

2. Basamak: Metilasyon karışımının hazırlanması

Restriksiyon kesimi için herbir örneğe dört farklı tüp hazırlandı.

I.tüp (Mo)

Reaksiyon karışımından 14 µl+ RNase/DNase free su 1µl

II.tüp (MSRE, Ms)

Reaksiyon karışımından 14 µl+ RNase/DNase free su 0,5µl+Ms enzim A 0,5µl

III tüp (MSDE, Md)

Reaksiyon karışımından 14 µl+ RNase/DNase free su 0,5µl+Md enzim B 0,5 µl

IV tüp (Msd)

Reaksiyon mikş karışımından 14 µl+ Ms enzim A 0,5µl+Md enzim B 0,5µl konuldu.

Tablo 3-1: DNA metilasyon enzim kesimi

	Tüpler			
	Mo	Ms	Md	Msd
Reaksiyon karışımı	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl
MSRE	-	0,5 µl	-	0,5 µl
MSDE	-	-	0,5 µl	0,5 µl
Su	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	-
Toplam	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

1. Tüpler 37°C de 16 saat PZR cihazında inkübe edildi.
2. Daha sonra 65°C 20 dk boyunca PZR cihazında bekletilerek enzimler ısı ile inaktif hale getirildi.
3. Hazırlanan örnekler plaklara aktararak 2000 RPM de 1 dk döndürüldü.
4. Plak RT-PZR (BIORAD CFX) cihazına konuldu ve aşağıdaki koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

PCR programı

- 10‘ 95°C 1 siklus
- 30“ 99°C
- 1‘ 72°C 3 siklus
- 15“ 97°C
- 1‘ 72°C 40 siklus

Testin değerlendirilmesi:

Genin metilasyon düzeyi GAPDH geni ile standardize edilerek ΔC_t matematiksel modeline göre hesaplanmıştır. Sonuçlar genin ilgili bölgesinin metillenmiş (M) ve metillenmemiş (UM) DNA miktarını yüzde olarak verir.

Testin geçerliliği; MSRE kesimi için ΔC_t (Md-Mo) ≥ 4 , MDRE kesimi için ΔC_t (MS-Mo) ≥ 4 ise kontrol DNA molekülünün % 93.8’den fazlanın sindirildiği ve restriksiyon enziminin aktif olduğu anlamına gelmektedir.

Aşağıdaki formüller kullanarak metilasyon yüzdesi hesaplandı.

$$C_{Mo}=2^{-Ct(Mo)}$$

$$C_{Ms}=2^{-Ct(Ms)}$$

$$C_{Md}=2^{-Ct(Md)}$$

$$C_{Msd}=2^{-Ct(Msd)}$$

Metillenmemiş DNA (UM) kesiri (F_{UM}):

$$F_{UM} = \frac{C_{Md}}{C_{Mo} - C_{Msd}} = \frac{2^{-Ct(Md)}}{2^{-Ct(Mo)} - 2^{-Ct(Msd)}}$$

Hipermetillenmiş DNA (HM)kesiri (F_M):

$$F_{HM} = \frac{C_{Ms}}{C_{Mo} - C_{Msd}} = \frac{2^{-Ct(Ms)}}{2^{-Ct(Mo)} - 2^{-Ct(Msd)}}$$

Orta Derecede Metillenmiş DNA kesiri (F_{IM}):

$$F_{IM} = 1 - F_{HM} - F_{UM}$$

Metillenmiş DNA kesiri (F_M):

$$F_M = F_{HM} - F_{IM}$$

Enzim Kesimine Dirençli DNA kopyası (R):

$$F_{HM} = \frac{C_{Msd}}{C_{Mo}} = \frac{2^{-Ct(Msd)}}{2^{-Ct(Mo)}}$$

R>12.5 ise test tekrar edilmelidir.

Örnek:

COSMC geni	Mo	Ms	Md	Msd	R	HM	U	M
Ct değerleri	23,16	27,11	24,89	36,51	0,0095%	6,47%	30,15%	69,85

3.2.9. Hücre kültür süpernatantında ve serumda GdIgA1 düzeyinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi (152)

Hasta ve kontrollerden kuru tüpte alınan kandan serum elde edildi. B hücre kültürü yapılan hasta ve kontrol gruplarından (AZA, IL-4 ve Kontrol) süpernatant ayrıldı ve çalışılacağı güne kadar -80°C’de saklandı. Serum ve süpernatanttaki GdIgA1 düzeyi ELISA kiti (Gd-IgA1 Assay Kit-IBL, Japonya) ile belirlendi (152). Testin standartları 100-1,56 ng/μL aralığındaydı. Serum örnekleri 1/250 oranında sulandırılıp, hücre süpernatantları dilüsyonsuz olarak teste konuldu. Anti-GdIgA1 (KM55) tavşan IgG antikoru kaplanmış test plağına belli konsantrasyonlardaki standartlar, hasta ve kontrollerin serum ve hücre kültür süpernatantlarından 50’şer μl belli kuyulara ilave

edildi. Bir saatlik inkübasyondan sonra 4 kez plak yıkandı. Plağın her kuyusuna 50 µl Horseradish (yabanturpu) peroksidaz (HRP) konjuge edilmiş Anti-insan IgA fare HRP antikoruna konuldu. Otuz dk oda ısısında inkübe edildi ve plak 5 kez yıkandı. Plağın her bir kuyusuna 50 µl sekonder antikor Tetra Metil Benzidin (TMB) ilave edildi. Plak 30 dk oda ısısında karanlıkta bekletildi. Plağın her bir kuyusuna 50 µl stop solüsyonu eklendi. Plak ELISA okuyucuda 450nm’de okutuldu ve optik dansite (OD) değerleri belirlendi. Standartların OD değerine göre oluşturulan standart eğri ile örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.3. İstatistiksel analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi Toplum Bilimleri İstatistik paketi (Statistical Package for Social Sciences, SPSS) 22.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U test kullanıldı. Bağımlı nicel verilerin analizinde Wilcoxon testi kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-kare test kullanıldı. Korelasyon analizinde Spearman Korelasyon analizi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya böbrek biyopsisi ile IgAN tanısı almış yetişkin 30 hasta, hastalarla birinci derece akrabalık ilişkisi olan 11 hasta yakını ve hastalarla hiçbir akrabalık ilişkisi olmayan sağlıklı 6 birey (kontrol grubu) dahil edildi. Hastaların cinsiyeti, yaşı, tanı anındaki serum kreatinin, proteinüri, takip süresi, kan basıncı değerleri Tablo 4-1’de belirtilmiştir.

Tablo 4-1: Çalışma gruplarının demografik ve klinik verileri

	IgAN			Hasta Yakını			Kontrol Grubu			p
	Ort.±s.s.	Med		Ort.±s.s.	Med		Ort.±s.s.	Med		
Yas	43,0 ± 14,3	39,5		45,0 ± 15,2	49,0		37,3 ± 7,6	37,0		0,638 ^k
Cinsiyet	Erkek	19	63,3%	9	30,0%		2	33,3%		0,138 ^{x²}
	Kadın	11	36,7%	2	6,7%		4	66,7%		
Serum kreatinin (mg/dl)	1,3 ± 0,7	1,2		0,7 ± 0,1	0,7		0,7 ± 0,0	0,7		0,004 ^k
GFR (ml/dak/1.73m ²)	76 ± 41	65		124 ± 28	128		132 ± 28	129		0,001 ^k
Proteinüri (gr/24 sa)	1,8 ± 1,2	1,6								
Global skleroz	21,0 ± 21,5	13,0								
Takip Süresi (ay)	31,0 ± 23,0	30,5								
SB	127 ± 14	123								
DB	81,5 ± 10,3	80,0								

^k Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test) / ^{x²} Ki-kare test

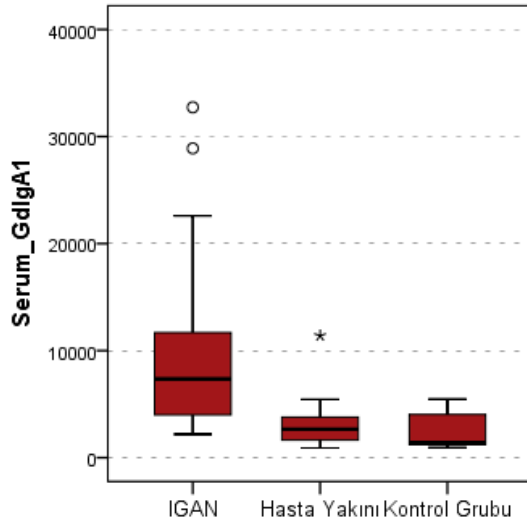
SB: Sistolik kan basıncı, DB: Diastolik kan basıncı

Serum kreatinin değeri, IgAN grubunda, hasta yakını ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek (p=0,004) bulunurken GFR değeri düşük (p=0,001) bulundu. Hasta yakını ve kontrol grubu arasında serum kreatinin ve GFR değeri açısından anlamlı (p>0.05) farklılık görülmedi (Tablo 4-1).

Çalışmada kullanılan hücre grupları, Grup I (Herhangi bir uyararla muamele edilmemiş B lenfositler), Grup II (10ng/ml IL-4 ile muamele edilen B lenfositler) ve Grup III (1µmol/L AZA ile muamele edilen B lenfositler) olarak üç gruba ayrıldı.

Hasta, hasta yakını ve sağlıklı kontrollerde serum GdIgA1 Düzeyi

IgAN grubunda serum GdIgA1 değeri, hasta yakını ve kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek (^op=0,000) saptanırken hasta yakını ve kontrol grubu arasında anlamlılık (*p>0.05) saptanamadı (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Çalışma gruplarında serum GdIgA1 düzeyleri

Grup I hücrelerde süpernatant GdIgA1 Düzeyi, COSMC mRNA ve COSMC DNA metilasyonu

Her üç gruptaki Grup I süpernatant GdIgA1 düzeyleri karşılaştırıldığında, hasta grubunda yüksek saptansa da anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Hastaların Grup I hücrelerinde COSMC DNA metilasyon oranı, diğer gruplara göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği saptandı ($p>0.05$) COSMC mRNA seviyesi, anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.000$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Çalışma gruplarında COSMC DNA metilasyonu, COSMC mRNA ve serum/hücre kültürü süpernatantında GdIgA1 Düzey Analiz Verileri

	IgAN		Hasta Yakını		Kontrol Grubu		p
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
Serum GdIgA1	9890±7987	7345	3425±2974	2663	2663±2404	1879	0,000 ^K
Süpernatant GdIgA1 (ng/μL) (Grup I)	19,9±35,3	7,1	4,9±5,1	2,5	10,2±12,5	3,3	0,06 ^K
COSMC DNA Metilasyonu (Grup I -%)	53,7±39,9	64	33,4±32,87	13	36,8±32,4	38,5	0,24 ^K
COSMC mRNA (Grup I-2 ^{-ΔΔCt})	0,4±0,10	0,13	1,3±1,2	0,8	2,7±,36	1,1	0,000 ^K

Hastalarda serum GdIgA1 düzeyi ile klinikopatolojik ilişki

Hastalarda serum GdIgA1 değeri ile cinsiyet, aile öyküsü, hematüri ve 0.5 g/24sa üstü proteinüri varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi ($p>0.05$). GFR 90 ml/dak/1.73m²'den fazla olan hastalarda serum GdIgA1 değeri, 90 ml/dak/1.73m²'den az olan hastalara göre anlamlı ($p=0.000$) olarak düşük bulundu. Serum GdIgA1 değeri ile proteinüri ve serum kreatinin arasında anlamlı ($p>0.05$) bir korelasyon saptanmazken GFR değeri ile anlamlı ($p=0.028$) negatif korelasyon mevcuttu. Hastaların yaş artışı ile serum GdIgA1 değeri arasında pozitif korelasyon ($p=0.044$) mevcuttu (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Serum GdIgA1 düzeyi ile klinik ilişki

			Serum GdIgA1 (ng/μL)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
Cinsiyet	Erkek	n=21	902 - 32729	3686	7623 ± 8461	0,308 ^m
	Kadın	n=9	1223 - 21964	5956	7066 ± 4915	
Yaş			$r=0.295 / p=0.044^s$			
Aile Öyküsü	(+)	n=6	2188 - 32729	8058	10468 ± 8776	0,677 ^m
	(-)	n=24	2845 - 17074	6662	7992 ± 4526	
Hematuri	(-)	n=23	3686 - 9930	5956	6001 ± 2317	0,276 ^m
	(+)	n=7	2188 - 32729	8328	10863 ± 8622	
Proteinüri			$r=0.279 / p=0.135^s$			
Proteinüri	0.5 [®] ≤	n=4	2845 - 21964	8423	10414 ± 8142	0,760 ^m
	0.5 [®] >	n=26	2188 - 32729	6746	9810 ± 8124	
GFR			$r=-0.401 / p=0.028^s$			
GFR	90* ≤	n=17	2888 - 32729	12650	8745 ± 9740	0,005^m
	90* >	n=13	2188 - 21964	6282	5226 ± 4861	
Serum Kreatinin			$r=0.347 / p=0.061^s$			

^m Mann-Whitney U test / ^s Spearman Korelasyon

[®]gr/24 sa *ml/dak/1.73m²

MEST skoru parametrelerinin her biri ile serum GdIgA1 değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) fark saptanamadı. Biyopsilerinde kresent pozitif olan hastaların serum GdIgA1 değeri, negatif olan gruptan anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,046$). Total MEST skoru (MEST parametrelerinin toplam pozitiflik değeri), Total MESTC (Total MEST skoru ile kresent pozitiflik birlikteliği) ve global skleroz ile serum GdIgA1 değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) korelasyon yoktu (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Serum GdIgA1 düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki

			Serum GdIgA1 (ng/ μ L)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort. $\pm$ s.s.	
M skoru	(-)	n=9	2827 - 17074	8058	7897 $\pm$ 4764	0,734 ^m
	(+)	n=21	2188 - 32729	6789	10745 $\pm$ 8993	
E skoru	(-)	n=28	2188 - 32729	7345	10077 $\pm$ 8237	0,868 ^m
	(+)	n=2	5956 - 8598	7277	7277 $\pm$ 1868	
S skoru	(-)	n=12	2827 - 28894	6746	8948 $\pm$ 7912	0,512 ^m
	(+)	n=18	2188 - 32729	8249	10519 $\pm$ 8202	
T skoru	(-)	n=13	2307 - 28894	6662	8746 $\pm$ 7996	0,295 ^m
	(+)	n=17	2188 - 32729	7900	10766 $\pm$ 8112	
Kresent	(-)	n=21	2307 - 32729	11671	8835 $\pm$ 8788	0,046^m
	(+)	n=9	2188 - 11707	5735	2892 $\pm$ 5769	
Total Mest			r=0.183/ p=0.334 ^s			
Total MestC			r=0.018/ p=0.926 ^s			
Global Skleroz			r=0.336 / p=0.070 ^s			

^m Mann-Whitney U test / ^s Spearman Korelasyon

Hasta Grup I süpernatant GdIgA1 düzeyi ile klinikopatolojik ilişki

Hastalarda süpernatant GdIgA1 değeri ile cinsiyet, aile öyküsü, hematüri ve 0.5 g/24sa üstü proteinüri varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$). GFR 90 ml/dak/1.73m²'den fazla olan hastalarda süpernatant GdIgA1 değeri, 90 ml/dak/1.73m²'den az olan hastalara göre anlamlı ($p=0.006$) olarak düşük bulundu. Süpernatant GdIgA1 değeri ile proteinüri arasında anlamlı ($p>0.05$) bir korelasyon saptanmazken GFR değeri ile anlamlı ($p=0.002$) negatif korelasyon, serum kreatinin değeri ($p=0.015$) ve yaş ile de anlamlı ($p=0.002$) pozitif korelasyon mevcuttu (Tablo 4-5).

MEST skoru parametrelerinin her biri ve biyopsilerdeki kresent varlığı ile süpernatant GdIgA1 değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) ilişki saptanamadı. Total MEST skoru (MEST parametrelerinin toplam pozitiflik değeri), Total MESTC (Total MEST skoru ile kresent pozitiflik birlikteliği) ve global skleroz ile süpernatant GdIgA1 değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) korelasyon yoktu (Tablo 4-6).

Tablo 4-5: Süpernatant GdIgA1 düzeyi ile klinik ilişki

			Süpernatant GdIgA1 (ng/μL)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
Cinsiyet	Erkek	n=21	1,1 - 155,9	4,8	17,5 ± 36,0	0,124 ^m
	Kadın	n=9	1,5 - 28,5	7,8	10,9 ± 8,2	
Yaş			$r=0.439 / p=0.002^S$			
Aile Öyküsü	(+)	n=6	1,7 - 155,9	7,2	21,5 ± 38,9	0,447 ^m
	(-)	n=24	1,2 - 57,8	5,5	14,5 ± 20,2	
Hematuri	(-)	n=23	3,2 - 21,2	6,1	7,9 ± 6,7	0,325 ^m
	(+)	n=7	1,2 - 155,9	7,5	22,8 ± 38,9	
Proteinüri			$r=0.155 / p=0.414^S$			
Proteinüri	0.5 [®] ≤	n=4	1,2 - 8,3	7,1	5,9 ± 3,2	0,502 ^m
	0.5 [®] >	n=26	1,7 - 155,9	7,0	22,0 ± 37,5	
GFR			$r=-0.533 / p=0.002^S$			
GFR	90* ≤	n=17	1,9 - 155,9	31,0	44,1 ± 12,7	0,006^m
	90* >	n=13	1,2 - 8,3	5,3	2,2 ± 5,4	
Serum Kreatinin			$r=0.439 / p=0.015^S$			

^m Mann-Whitney U test / ^S Spearman Korelasyon[®]gr/24 sa *ml/dak/1.73m²**Tablo 4-6: Süpernatant GdIgA1 düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki**

			Süpernatant GdIgA1(ng/μL)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
M skoru	(-)	n=9	1,2 - 57,8	12,7	20,3 ± 20,0	0,175 ^m
	(+)	n=21	1,7 - 155,9	6,6	19,7 ± 40,6	
E skoru	(-)	n=28	1,2 - 155,9	7,1	20,9 ± 36,3	0,506 ^m
	(+)	n=2	3,6 - 7,8	5,7	5,7 ± 3,0	
S skoru	(-)	n=12	1,2 - 155,9	7,1	23,9 ± 43,6	0,966 ^m
	(+)	n=18	1,7 - 124,1	6,9	17,2 ± 29,5	
T skoru	(-)	n=13	1,2 - 155,9	6,6	18,2 ± 41,6	0,295 ^m
	(+)	n=17	1,9 - 124,1	7,2	21,1 ± 30,9	
Kresent	(-)	n=21	1,2 - 155,9	25,2	41,2 ± 7,8	0,213 ^m
	(+)	n=9	3,2 - 19,2	7,4	5,0 ± 5,5	
Total Mest			$r=0.106 / p=0.578^S$			
Total MestC			$r=-0.030 / p=0.876^S$			
Global Skleroz			$r=-0.051 / p=0.789^S$			

^m Mann-Whitney U test / ^S Spearman Korelasyon

COSMC mRNA analizi ile klinikopatolojik ilişki

Hastalarda COSMC mRNA seviyesi ile cinsiyet, hematüri, 0.5 g/24sa üstü proteinüri ve GFR değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Ailesel IgAN olan hastalarda COSMC mRNA seviyesi anlamlı ($p=0.012$) olarak düşük bulundu. COSMC mRNA seviyesi ile yaş, serum kreatinin, proteinüri ve GFR değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) bir korelasyon saptanmadı (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: COSMC mRNA seviyesi ile klinik ilişki

			COSMC mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
Cinsiyet	Erkek	n=21	0,00 - 4,14	0,24	0,73 ± 1,08	0,947 ^m
	Kadın	n=9	0,01 - 9,39	0,24	1,25 ± 2,39	
Yaş			$r=-0.032/ p=0.833^S$			
Aile Öyküsü	(+)	n=6	0,01 - 3,21	0,14	0,51 ± 0,95	0,012^m
	(-)	n=24	0,00 - 0,06	0,03	0,04 ± 0,02	
Hematuri	(-)	n=23	0,01 - 0,34	0,06	0,13 ± 0,14	0,756 ^m
	(+)	n=7	0,00 - 3,21	0,09	0,47 ± 0,94	
Proteinüri			$r=-0.021/ p=0.913^S$			
Proteinüri	0.5 [®] ≤	n=4	0,00 - 0,74	0,17	0,27 ± 0,33	0,760 ^m
	0.5 [®] >	n=26	0,01 - 3,21	0,07	0,42 ± 0,91	
GFR			$r=-0.0710/ p=0.713^S$			
GFR	90* ≤	n=17	0,0 - 3,0	0,4	0,9 ± 0,1	0,544 ^m
	90* >	n=13	0,0 - 3,2	0,4	0,9 ± 0,1	
Serum Kreatinin			$r=0.074/ p=0.698^S$			

^m Mann-Whitney U test / ^S Spearman Korelasyon

[®]gr/24 sa *ml/dak/1.73m²

MEST skoru parametrelerinin her biri ve biyopsilerdeki kresent varlığı ile COSMC mRNA seviyesi arasında anlamlı ($p>0.05$) ilişki saptanamadı. Total MEST skoru (MEST parametrelerinin toplam pozitiflik değeri), Total MESTC (Total MEST skoru ile kresent pozitiflik birlikteliği) ve global skleroz ile COSMC mRNA seviyesi arasında anlamlı ($p>0.05$) korelasyon yoktu (Tablo 4-8).

COSMC geni DNA metilasyon düzeyi analizi ile klinikopatolojik ilişki

Hastalarda COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile cinsiyet, aile öyküsü, hematüri, 0.5 g/24sa üstü proteinüri ve GFR değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu ($p>0.05$). COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile yaş, serum kreatinin,

proteinüri ve GFR değeri arasında anlamlı ($p>0.05$) bir korelasyon saptanmadı (Tablo 4-9).

Tablo 4-8: COSMC mRNA seviyesi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki

			COSMC mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
M skoru	(-)	n=9	0,00 - 2,36	0,07	0,41 ± 0,77	0,700 ^m
	(+)	n=21	0,01 - 3,21	0,08	0,40 ± 0,90	
E skoru	(-)	n=28	0,00 - 3,21	0,09	0,43 ± 0,88	0,360 ^m
	(+)	n=2	0,03 - 0,06	0,04	0,04 ± 0,02	
S skoru	(-)	n=12	0,00 - 2,36	0,11	0,35 ± 0,67	0,641 ^m
	(+)	n=18	0,01 - 3,21	0,06	0,43 ± 0,98	
T skoru	(-)	n=13	0,00 - 3,21	0,07	0,58 ± 1,02	0,325 ^m
	(+)	n=17	0,01 - 2,99	0,08	0,27 ± 0,71	
Kresent	(-)	n=21	0,0 - 3,2	0,4	0,9 ± 0,1	0,769 ^m
	(+)	n=9	0,0 - 2,4	0,4	0,8 ± 0,1	
Total Mest			$r=-0.130$ / $p=0.493^S$			
Total MestC			$r=-0.120$ / $p=0.527^S$			
Global Skleroz			$r=-0.250$ / $p=0.183^S$			

^m Mann-Whitney U test / ^S Spearman Korelasyon

Tablo 4-9: COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile klinik ilişki

			COSMC DNA Metilasyon (%)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
Cinsiyet	Erkek	n=21	0,00 - 1,00	0,11	0,39 ± 0,41	0,059 ^m
	Kadın	n=9	0,13 - 1,00	0,64	0,61 ± 0,28	
Yaş			$r=0.285$ / $p=0.052^S$			
Aile öyküsü	(+)	n=6	0,00 - 1,00	0,64	0,51 ± 0,43	0,844 ^m
	(-)	n=24	0,00 - 1,00	0,64	0,62 ± 0,31	
Hematuri	(-)	n=23	0,00 - 1,00	0,83	0,61 ± 0,48	0,658 ^m
	(+)	n=7	0,00 - 1,00	0,64	0,52 ± 0,39	
Proteinüri			$r=0.176$ / $p=0.353^S$			
Proteinüri	0.5 [®] ≤	n=4	0,00 - 0,98	0,32	0,41 ± 0,49	0,391 ^m
	0.5 [®] >	n=26	0,00 - 1,00	0,65	0,56 ± 0,39	
GFR			$r=-0.305$ / $p=0.101^S$			
GFR	90* ≤	n=17	0,00 - 1,00	0,67	0,38 ± 0,76	0,051 ^m
	90* >	n=13	0,00 - 1,00	0,37	0,38 ± 0,15	
Serum Kreatinin			$r=0.214$ / $p=0.255^S$			

^m Mann-Whitney U test / ^S Spearman Korelasyon

[®]gr/24 sa *ml/dak/1.73m²

MES skoru parametrelerinin her biri ve biyopsilerdeki kresent varlığı ile COSMC geni DNA metilasyon düzeyi arasında anlamlı ($p>0.05$) ilişki saptanamazken T skoru pozitif hastalarda COSMC geni DNA metilasyon düzeyi anlamlı olarak yüksek ($p=0.037$) bulundu. Total MEST skoru (MEST parametrelerinin toplam pozitiflik değeri), Total MESTC (Total MEST skoru ile kresent pozitiflik birlikteliği) ve global skleroz ile COSMC mRNA seviyesi arasında anlamlı ($p>0.05$) korelasyon yoktu (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: COSMC geni DNA metilasyon düzeyi ile patolojik bulgular arasındaki ilişki

			COSMC DNA Metilasyon (%)			p
			Min-Mak	Medyan	Ort.±s.s.	
M skoru	(-)	n=9	0,00 - 0,98	0,62	0,43 ± 0,38	0,285 ^m
	(+)	n=21	0,00 - 1,00	0,67	0,58 ± 0,41	
E skoru	(-)	n=28	0,00 - 1,00	0,65	0,55 ± 0,41	0,559 ^m
	(+)	n=2	0,15 - 0,63	0,39	0,39 ± 0,34	
S skoru	(-)	n=12	0,00 - 1,00	0,95	0,64 ± 0,45	0,131 ^m
	(+)	n=18	0,00 - 1,00	0,64	0,47 ± 0,36	
T skoru	(-)	n=13	0,00 - 1,00	0,23	0,38 ± 0,39	0,037^m
	(+)	n=17	0,00 - 1,00	0,76	0,66 ± 0,37	
Kresent	(-)	n=21	0,0 - 1,0	0,4	0,4 ± 0,6	0,127 ^m
	(+)	n=9	0,1 - 1,0	0,7	0,3 ± 0,8	
Total Mest			r=0.092 / p=0.631 ^s			
Total MestC			r=0.180 / p=0.342 ^s			
Global Skleroz			r=0.057 / p=0.765 ^s			

^m Mann-Whitney U test / ^s Spearman Korelasyon

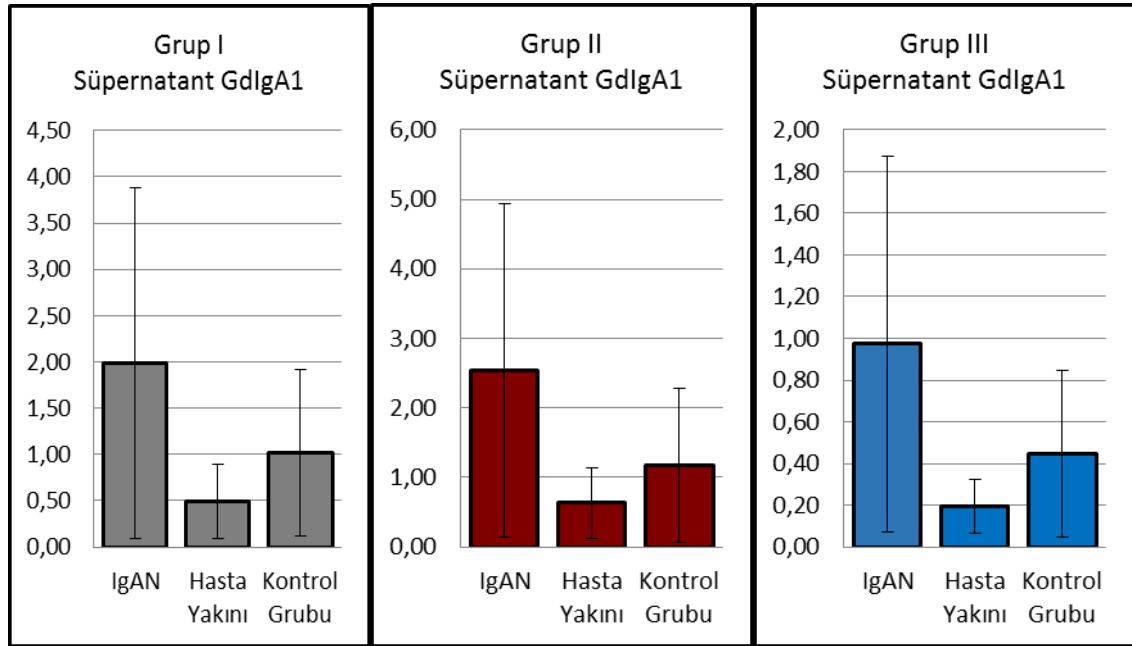
GdIgA1 düzeyi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

Grup I ve Grup II hücrelerinde süpernatant GdIgA1 düzeyi, IgAN grubunda, hasta yakını ve kontrol grubuna göre daha yüksek olsa da anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). Grup III süpernatant GdIgA1 düzeyi, IgAN grubunda, hasta yakını grubundan anlamlı olarak yüksek ($p=0.006$) iken, kontrol grubu ile anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 4-11) (Şekil 4-2).

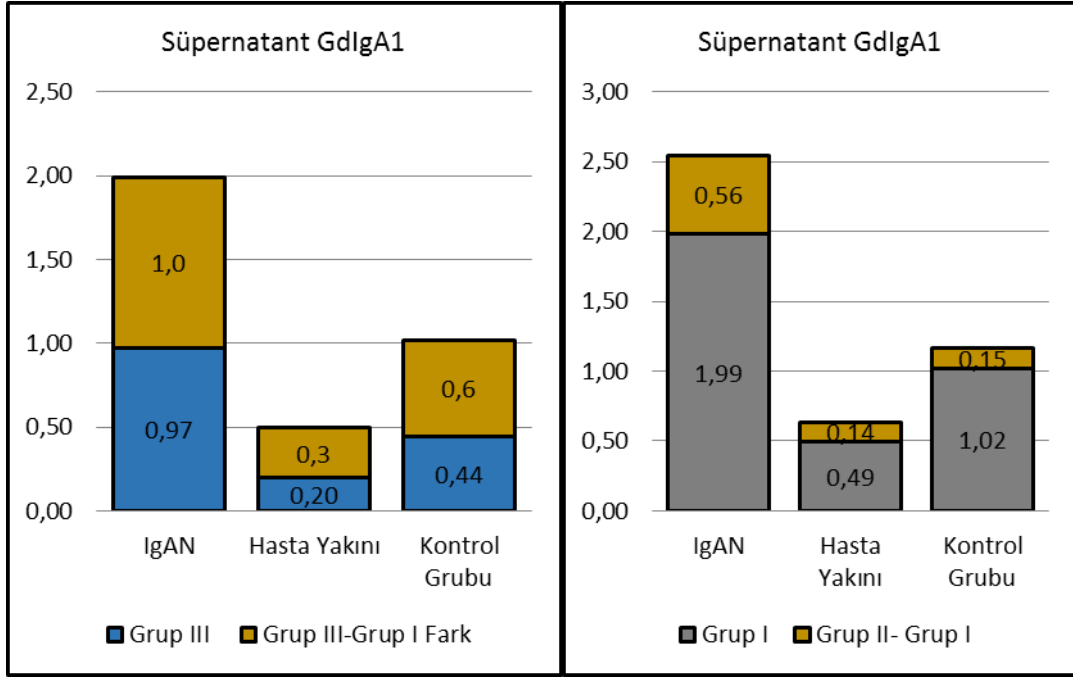
Tablo 4-11: Çalışma gruplarında GdIgA1 düzeyi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

	IgAN		Hasta Yakını		Kontrol Grubu		p
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
Süpernatant GdIgA1(ng/μL)							
Grup I	1,99 ± 3,53	0,71	0,49 ± 0,51	0,25	1,02 ± 1,25	0,33	0,060 κ
Grup II	2,55 ± 4,83	0,79	0,63 ± 0,51	0,41	1,17 ± 1,54	0,37	0,149 κ
Grup III	0,97 ± 1,71	0,41	0,20 ± 0,13	0,16	0,44 ± 0,54	0,19	0,006 κ
Değişim							
Grup I-Grup III	1,01 ± 2,04	0,36	0,30 ± 0,41	0,10	0,57 ± 0,77	0,14	0,448 κ
Değişim p	0,000 w		0,008 w		0,028 w		
Grup I-Grup II	0,56 ± 2,21	0,09	0,14 ± 0,34	0,04	0,15 ± 0,42	0,00	0,707 κ
Değişim p	0,078 w		0,108 w		0,753 w		

^κ Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test) / ^w Wilcoxon test

**Şekil 4-2: Hücre gruplarında çalışma gruplarına göre GdIgA1 düzeyi**

IgAN grubunda Grup II süpernatant GdIgA1 düzeyi, Grup I süpernatant GdIgA1 düzeyine göre artış gösterse de aralarındaki değişim anlamlılık göstermedi ($p > 0.05$). IgAN, hasta yakını ve kontrol gruplarının Grup I GdIgA1 düzeyine göre Grup III GdIgA1 düzey değişimi anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p = 0,000$, $p = 0,008$, $p = 0,028$) (Tablo 4-11) (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: GdIgA1 düzeyinin gruplar arası değişimi

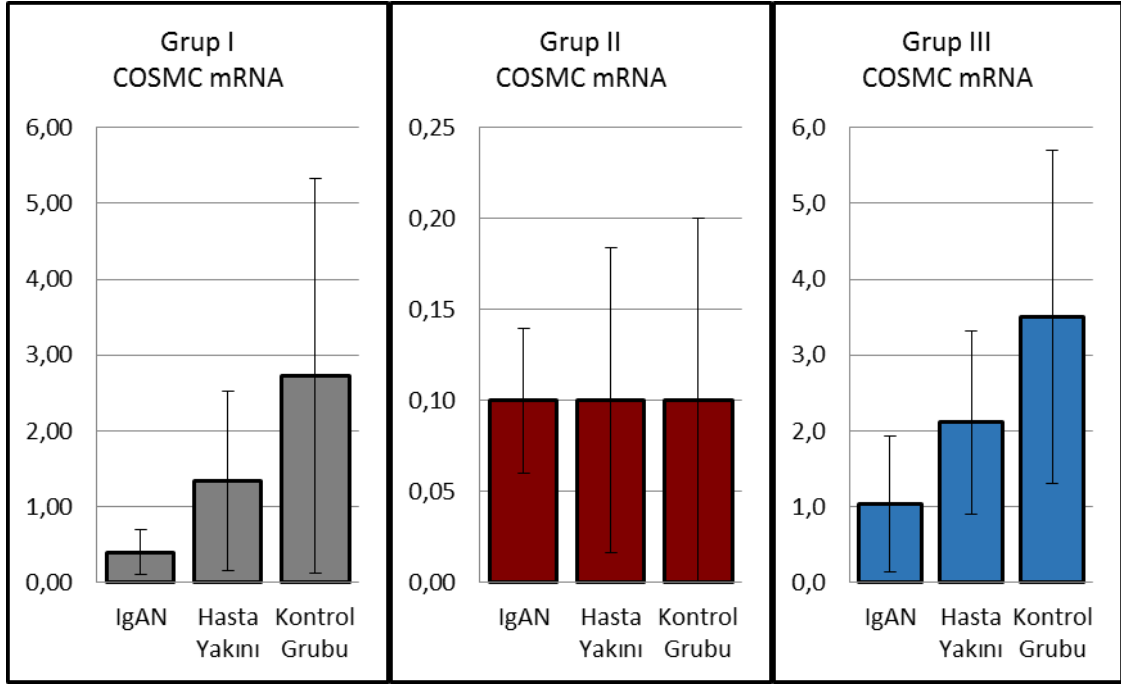
COSMC mRNA seviyesi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

Grup II hücrelerinde COSMC mRNA seviyesi, IgAN, hasta yakını ve kontrol grupları arasında farklılık göstermedi ($p > 0.05$). Grup I ve Grup III hücrelerinde COSMC mRNA seviyesi, IgAN grubunda, hasta yakını ve kontrol grubuna göre daha düşük saptandı (sırasıyla $p = 0.000$, $p = 0.001$) (Tablo 4-12) (Şekil 4-4).

Tablo 4-12: Çalışma gruplarında COSMC mRNA seviyesi üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

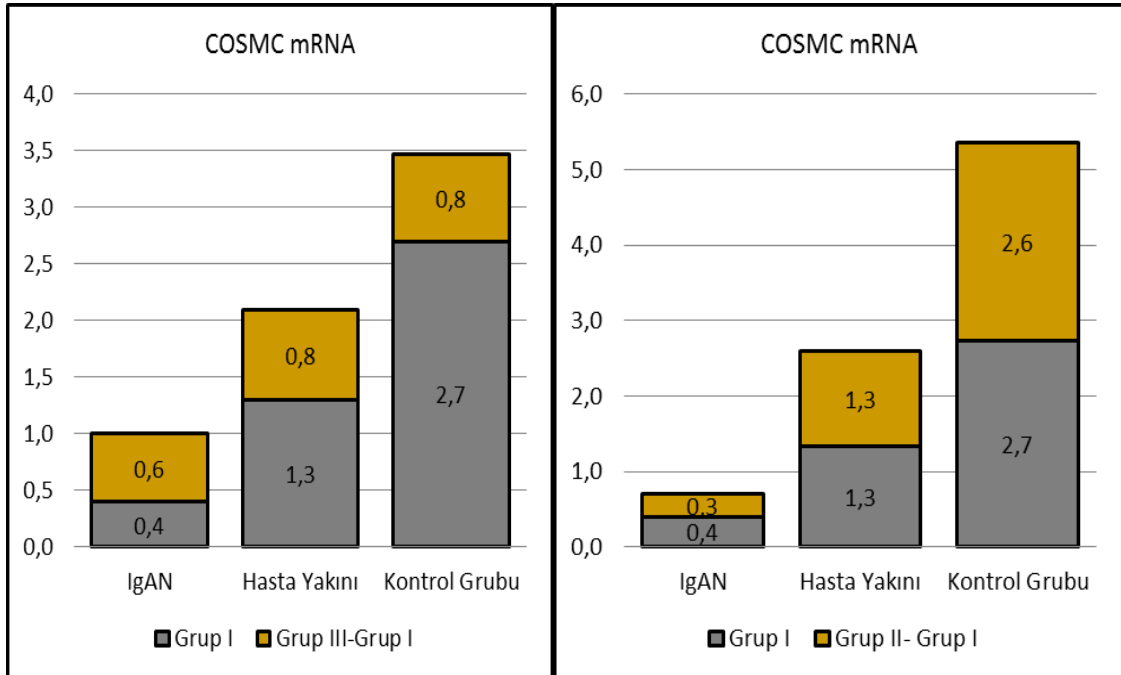
	IgAN		Hasta Yakını		Kontrol Grubu		p
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
COSMC mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)							
Grup I	0,4 ± 0,9	0,1	1,3 ± 1,2	0,8	2,7 ± 3,6	1,1	0,000 ^K
Grup II	0,1 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,1	0,1	0,1 ± 0,1	0,1	0,125 ^K
Grup III	1,0 ± 1,1	0,7	2,1 ± 1,2	2,4	3,5 ± 2,2	3,0	0,001 ^K
Değişim							
Grup I-Grup III	-0,6 ± 1,5	-0,5	-0,8 ± 1,8	-0,7	-0,8 ± 4,5	-1,7	0,739 ^K
Değişim p	0,000 ^w		0,003 ^w		0,028 ^w		
Grup I-Grup II	-0,3 ± 0,9	-0,1	-1,3 ± 1,2	-0,7	-2,6 ± 3,6	-0,9	0,000 ^K
Değişim p	0,004 ^w		0,155 ^w		0,600 ^w		

^K Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test) / ^w Wilcoxon test



Şekil 4-4: Hücre gruplarında çalışma gruplarına göre COSMC mRNA seviyesi

IgAN grubunda Grup I COSMC mRNA seviyesi, Grup II'den anlamlı olarak yüksek ($p=0,004$), Grup III'den düşük bulundu ($p=0,000$). Hasta yakını ve kontrol gruplarında Grup I COSMC mRNA seviyesi, Grup III'den anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=,028$) (Tablo 4-12) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: COSMC mRNA seviyesinin gruplar arası değişimi

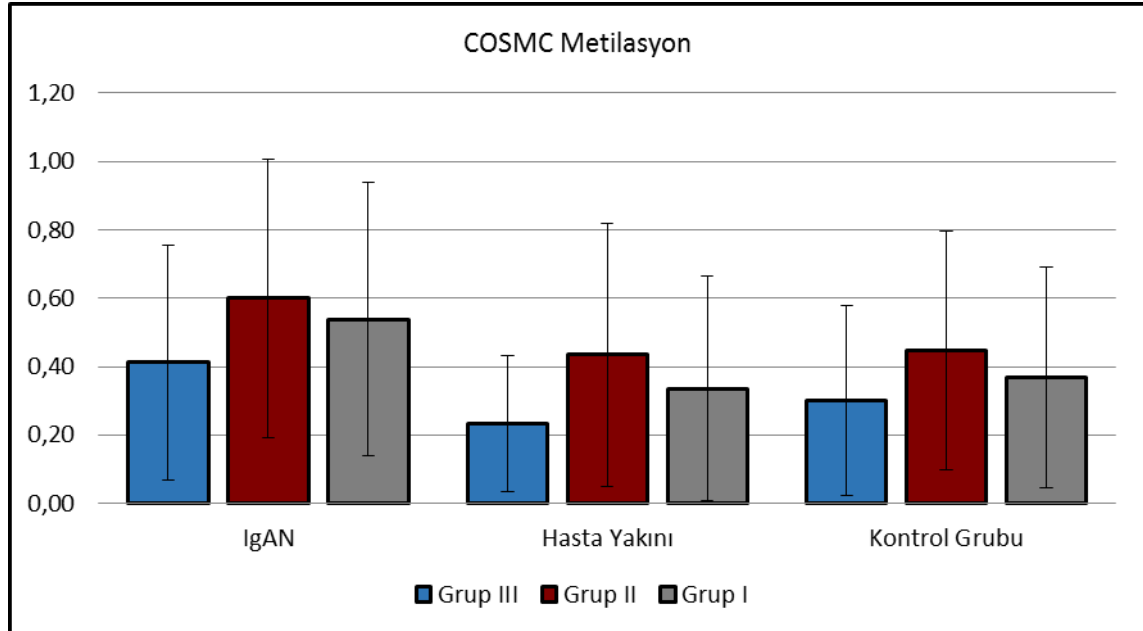
COSMC DNA metilasyonu üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

Grup I, Grup II ve Grup III hücreleri DNA metilasyon oranları, IgAN, hasta yakını ve kontrol gruplarında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4-13) (Şekil 4-6).

Tablo 4-13: COSMC DNA metilasyonu üzerine IL-4 ve AZA'nın etkisi

	IgAN		Hasta Yakını		Kontrol Grubu		P
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
COSMC DNA Metilasyon (%)							
Grup I	0,54 ± 0,40	0,64	0,33 ± 0,33	0,13	0,37 ± 0,32	0,39	0,235 ^K
Grup II	0,60 ± 0,41	0,73	0,43 ± 0,39	0,52	0,45 ± 0,35	0,50	0,282 ^K
Grup III	0,41 ± 0,34	0,52	0,23 ± 0,27	0,13	0,30 ± 0,28	0,29	0,597 ^K
Değişim							
Grup I-Grup III	0,13 ± 0,35	0,07	0,10 ± 0,35	0,02	0,07 ± 0,08	0,04	0,893 ^K
Değişim p	0,019 ^w		0,113 ^w		0,109 ^w		
Grup I-Grup II	0,06 ± 0,32	0,01	0,10 ± 0,19	0,03	0,08 ± 0,22	0,03	0,789 ^K
Değişim p	0,094 ^w		0,092 ^w		0,674 ^w		

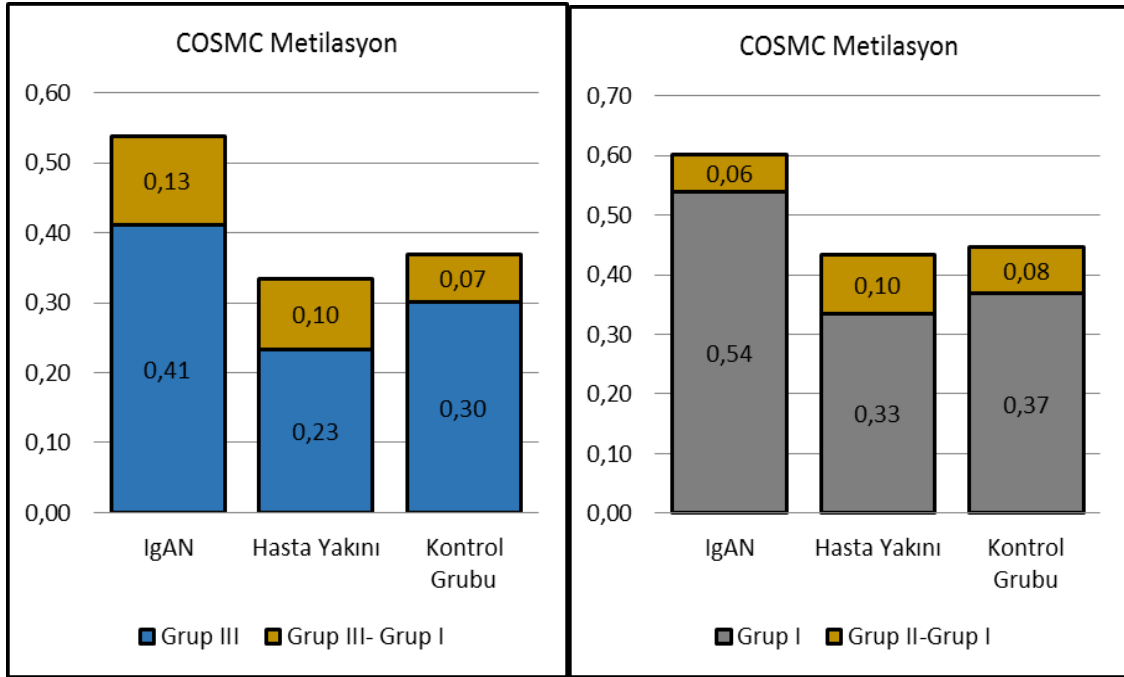
^k Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test) / ^w Wilcoxon test



Şekil 4-6: Çalışma gruplarında hücre gruplarına göre COSMC DNA metilasyon oranı

IgAN hastalarının Grup I hücrelerinde DNA metilasyonu %54 oranında görülürken Grup II 'de bu oran %60'a yükselmiş, Grup III'de ise %41'e gerilemiştir. Hasta grubunda Grup I ile Grup III arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı

bulundu ($p=0,019$) (Şekil 4-7). Grup I ile Grup II arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p>0,05$) (Tablo 4-13) (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: COSMC DNA metilasyon oranının gruplar arası değişimi

5. TARTIŞMA

İmmünglobulin (Ig) A nefropatisi (IgAN) dünyada en yaygın görünen primer glomerulonefrittir (1). Çoğunlukla sessiz seyretmesine rağmen; hastaların %30-40'ında son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişmektedir. Hastalığın kesin tanısı böbrek biyopsisi ile konulabilmektedir. Birçok ülkede biyopsilere yönelik seçici yaklaşım göz önüne alındığında, hastalığın görülme sıklığında bölgesel farklılıklar bulunmaktadır. Hastalık Kafkasya ve Asya popülasyonunda çok yaygın görülmektedir (2).

Hem erişkin hem de çocuk hastalarda, IgAN'nın belirgin özellikleri mezanjiyal hipersellülarite ve glomerüler mezanjiyumda IgA birikimidir. Hastalıkta primer defekt, IgA1'in menteşe (bağlantı) bölgesinin anormal glikozillenmesidir. IgA1'in kusurlu glikozilasyonu ile başlayan süreç, GdIgA1'in aşırı üretimi, anti-GdIgA1 oluşumu ve nefritojenik immün komplekslerin mezanjiyumda birikmesi ile sonuçlanır (152).

IgAN hasta serumlarında GdIgA1 seviyesi oldukça yüksek bulunmuştur (2). C1GalT1 enzimi, GalNAc kalıntılarına sağlıklı bireylerde galaktoz molekülünü eklerken, IgAN hastalarında, galaktoz molekülünden önce siyalik asit eklemektedir. Siyalik asit eklenmesi, galaktoz eklenmesini engellemekte ve böylece galaktozillenmesi yetersiz glikanların oluşmasına neden olmaktadır (32). C1GalT1 enzimlerinin ekspresyonu için COSMC (C1GalT1C1) gerekmektedir. COSMC, ER'de bulunan moleküler bir şaperondur (72). COSMC, yeni sentez edilmiş C1GalT1 enzimi ile etkileşime geçerek, kümeleşmesini ve proteozomal parçalanmasını engelleyerek, aktif formda kalmasını sağlamaktadır (73-77).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, COSMC ekspresyonunun regülasyonu tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte COSMC geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu ile epigenetik olarak susturulduğu ve böylece COSMC ekspresyonunun azaldığı düşünülmektedir (96). Bunun sonucunda aktif olmayan bir C1GalT1 olduğu ve böylece O-glikanları olmayan Tn ve STn antijenlerinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (82). Tn antijeninin aşırı ekspresyonu, Tn sendromu, IgA nefropatisi ve insan tümörleri dahil bazı hastalıklarda görülmektedir (88-90).

IgAN hastalarında teşhis anında proteinüri ve azalmış GFR en önemli laboratuvar bulgularıdır (153). Bu çalışmaya dahil edilen hastaların tanı anında ortalama

proteinüri değerleri 1,6 gr/24sa olarak hesaplanırken, ortalama GFR değerleri hasta yakını ve sağlıklı kontrollere göre düşük bulundu.

IgAN'nın klinik özellikleri, hastalar arasında değişiklik göstermektedir. Biyopsi örneklerinde glomerüler IgA1 birikiminin yanısıra bazen IgG ve/veya IgM'inde eşlik ettiği görülmüştür. IgAN hastalarında mikroskopik hematüri ve düşük proteinüri sık rastlanan laboratuvar bulguları olmasına rağmen bazı olgularda kresentik glomerülonefrit görülmektedir. Böyle hastaların klinik seyiri hızlı ilerlemekte ve uzun vadede kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır. Erken teşhis ve tedavi, hastalığın ilerlemesini önlemek veya yavaşlatmak için önemlidir. Hastalığın tanısının sadece böbrek biyopsisi ile konulabiliyor olması, non-invaziv bir biyomarker geliştirilmesi gerekliliğini doğurmuştur (43). Yanagawa ve ark. (43), serum GdIgA1 düzeyinin IgAN'lı hastalarda, sağlıklı ve IgAN dışı SDBY'li hastalarına göre daha yüksek olduğunu ve serum GdIgA1'in IgAN'sini diğer glomerüler hastalıklardan ayırmada yardımcı olabileceğini söylemiştir. Moldoveanu ve ark.'ları (154), IgA tanısı konmuş erişkin Kafkas hastaların %75'inde GdIgA1'in serum seviyelerinin yüksek olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde Shimosato ve ark.'ları (155) da IgAN hastalarında serum GdIgA1 düzeylerinin önemli ölçüde yüksek bulunduğu fakat hastalık şiddeti ile GdIgA1 düzeyi arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Gale ve ark.'ları (156), GdIgA1 düzeylerinin etnik olarak eşleştirilmiş sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında IgAN hastalarında yüksek olduğunu ve hastalık progresyonu ile korelasyon gösterdiğini saptamıştır. Sun ve ark.'ları (157) 450 IgAN hastasını kapsayan 12 çalışmanın meta analizi sonucunda hastaların GdIgA1 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada da literatürlerle uyumlu olarak IgAN hasta grubunda hasta yakını ve sağlıklı kontrollere göre serum GdIgA1 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu da serum GdIgA1 düzeyinin IgAN hastaları için non-invaziv bir tanı kriteri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Ghafari ve ark.'ları (158), IgAN hastalarının böbrek hastalığının klinik bulgusu olmayan birinci derece yakınlarının yaklaşık yarısında yüksek Gd-IgA1 düzeyleri tespit etmiş ve bunun Kafkas ırkı için kalıtsal olabileceğini bildirmiştir. Hastings ve ark.'ları (159), Afrika kökenli Amerikalı sporadik vakaların %78'inde ve onların birinci derece akrabalarının %25'inde yüksek serum Gd-IgA1 düzeyine sahip olduğunu bildirmiştir.

Çinli IgAN hastalarının birinci derece yakınlarının da serum Gd-IgA1 düzeyleri anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (160).

Bu çalışmaya dahil edilen hastaların IgAN bulgusu olmayan birinci derece yakınlarında GdIgA1 düzeyleri, IgAN hasta grubuna göre düşük bulunurken, sağlıklı kontrollere göre kısmen yüksek bulunsada anlamlı bir farklılık görülmedi.

Total IgA düzeyi, sağlıklı çocuklarda yaşı ilerlemesi ile artmaktadır (161). Hastings ve ark.'ları (159), erişkin ve çocuk hastaları dahil ettikleri çalışmalarında serum GdIgA1 düzeylerinin yaşa göre değiştiğini, Kiryluk ve ark.'ları (162), GdIgA1 düzeylerinin yaşla korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Berthoux ve ark.'ları (47) ise 97 IgAN hastasını dahil ettikleri çalışmalarında GdIgA1 düzeyleri ile yaş veya cinsiyet arasında korelasyon olmadığını bildirmiştir.

Yaptığımız bu çalışma, Kiryluk ve ark.'larının çalışmalarına benzer şekilde yaş ile serum GdIgA1 düzeyi arasında korelasyon olduğunu bildirirken cinsiyetle herhangi bir korelasyon gösterememiştir. Bu durum serum GdIgA1 testinin tanı amaçlı kullanılabilmesi için yaşa uygun serum düzeyi standardizasyonun yapılarak normal seviye sınırlarının belirlenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

IgAN hastalarında serum GdIgA1 seviyesi, SDBY gelişmesinin yanı sıra hematüri veya proteinüri ile de ilişkili bulunmuştur (47). Camilla ve ark.'ları (163) yaptıkları çalışmalarında, artmış serum GdIgA1 düzeyinin yüksek proteinüri ile korele olduğunu göstermiştir. Yanagawa ve ark.'larının (43) yaptığı çalışmada da düşük proteinürisi olan IgAN hastalara kıyasla orta ya da yüksek derecede proteinürisi olan IgAN hastalarında artan serum Anti-GdIgA1 antikor seviyeleri saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada GdIgA1'e spesifik IgG'nin hastalık şiddetinin bir göstergesi olabileceği ancak prognostik yararının bağımsız prospektif kohortlarda doğrulanması gerekliliği vurgulanmıştır. Moldoveanu ve ark.'ları (154), Kafkas kohortunda Gd-IgA1 ile proteinüri arasında korelasyon olmadığını bildirirken, Shimosato ve ark.'ları (155) da Japon kohortunda benzer bir sonuç bildirmiştir. Hastings ve ark.'ları (164), çocuk hasta grubunda da bu korelasyonu gösterememiş ve bunu hasta grubunda proteinüri seviyesi düşük hasta sayısının fazlalığından kaynaklanabileceğini söylemiştir.

Bu çalışmada hastaların GdIgA1 düzeyi ile proteinüri değerleri arasında korelasyon bulunamadı. Bunun olası nedeni hastalığın şiddetindeki fark, hastaların

ortalama proteinüri değerlerinin düşük olması ya da düşük proteinürisi olan hasta sayısının fazla olmasından kaynaklanabilir.

Moldoveanu ve ark.'ları (154), erişkin Kafkas hastalarda serum GdIgA1 düzeylerinin GFR ile korelasyon göstermediğini bildirirken Berthoux ve ark.'ları (47), yüksek serum GdIgA1 düzeyi ile GFR'nin hızlı düşüşü arasında korelasyon olduğunu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da Berthoux ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde serum GdIgA1 düzeyi ile GFR arasında korelasyon bulunmuştur. GFR değerinin, IgAN'nin en önemli laboratuvar bulgularından biri olabileceğini düşünülen serum GdIgA1 düzeyi ile korelasyon göstermesi hastalığın tanı ve prognozunda bu parametrenin biyobelirteç olarak kullanılabilmesinin önünü açtığı şeklinde yorumlanabilir.

Coppo ve ark.'ları (165), yetişkin IgAN hastalarında GdIgA1'in, böbrek patoloji bulgusu ile yakından ilişkili olduğunu ve IgAN'nın seyrini ve klinik bulgularını etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Camilla ve ark.'ları (163) yetişkin ve çocuk IgAN hastalarını incelemiş ve GdIgA1/IgA yüzdesi ile eşzamanlı üriner protein/kreatinin oranı arasında marjinal olarak anlamlı bir korelasyon bulmuştur. Zhao ve ark.'ları (166) da Çinli IgAN hastalarında GdIgA1 düzeyinin hastalığın ilerlemesinde etkili bir faktör olduğunu belirtmiştir. Buna karşın Suzuki ve ark.'ları (35), IgAN hastalığının gelişimi için yüksek serum GdIgA1 seviyesinin gerekli olduğu fakat renal hasarın oluşabilmesi için yeterli olmadığını, hastalığın gelişmesi için immün komplekslerin oluşması gerektiğini bildirmiştir. Moldoveanu ve ark.'ları (154), yetişkin 153 IgAN hastasında serum GdIgA1 düzeylerinin GFR ve proteinüri gibi klinik parametrelerle ve histolojik anormallik ile korelasyon göstermediğini belirtmiş ve serum GdIgA1 düzeyinin prognozdan ziyade hastalık riski açısından önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmiştir. Jiang ve ark.'ları (167) farklı klinik ve patolojisi olan hastalarda serum GdIgA1 seviyelerinde anlamlı farklılık olmadığını göstermiştir. Eison ve ark.'ları (168), MEST skoru negatif minimal glomerular değişikliği olan hastalarla ışık mikroskopisinde IgG negatif fakat belirgin glomerular lezyonu olan hastalar arasında prognoz açısından farklılık göstermemiştir. Aynı çalışma hastaların spesifik histolojik lezyonları ile serum GdIgA1 seviyeleri arasındaki ilişkileri saptamak için daha kapsamlı bir analiz gerekliliğini belirtmiştir. Sun ve ark.'ları (157), 185 hastanın dahil edildiği

toplam 5 çalışmanın incelendiği meta analiz çalışmasında, histopatolojik derecelendirmeye bağlı olarak hafif ve ağır IgAN olarak sınıflandırılan hastalarda GdIgA1 düzeyleri ile klinik-patolojik değişiklikler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda, benzer şekilde serum GdIgA1 düzeyi ile GFR dışında diğer klinik parametreler, MEST skorları ve global skleroz arasında korelasyon görülmedi. Ancak kresent görülen hastalarda görülmeyenlere göre serum GdIgA1 düzeyi daha yüksek bulundu. Kryluk ve ark.'larının (162) da belirttiği gibi, yüksek serum GdIgA1 seviyesinin herhangi bir spesifik klinik-patolojik özellik ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Sun ve ark.'ları (157), IgAN hastaları ile yapılan altı çalışmanın toplandığı meta analiz sonuçlarına dayanarak, hastaların tonsillerinden elde edilen mononükleer hücreler ya da periferik kandan elde edilen B lenfositlerinin kültür süpernatantında tespit ettikleri GdIgA1 seviyesinin, sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir. Ji ve ark.'ları (169) çalışmalarında, hastaların B lenfosit kültür süpernatantında GdIgA1 düzeyinin yüksek olduğunu bildirirken, Xie ve ark.'ları (170), kontrollere göre hastaların kültüre edilen B lenfosit süpernatantında GdIgA1 düzey artışını 5. Günden sonra görmeye başladıklarını bildirmiştir.

Çalışmamızda hastaların periferik kanından elde edilen ve 3 günlük kültüre edilmiş B lenfosit süpernatantında GdIgA1 seviyesi sağlıklı kontrollere göre yüksek saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum, yapılan çalışmalarda kültüre edilen hücrelerin kaynaklarının farklı olması, hücre sayıları ve kültür sürelerinin standardizasyonunun olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Hastaların süpernatant GdIgA1 düzeyi, serum düzeyi ile benzer şekilde hastaların yaşı, serum kreatinin ve GFR değerleri ile korelasyon gösterdiği fakat histopatolojik bulgular üzerine etkili olmadığı bulundu.

IgAN hastalarının periferik B lenfositinde COSMC mRNA seviyesinin belirgin olarak düşük olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (157,170-172). Jing Shao ve ark.'ları (173), IgAN hastalarının tonsillerinden elde edilen mononükleer hücrelerde COSMC mRNA seviyesinin IgAN olmayan böbrek hastalarına göre düşük olduğunu bildirirken, COSMC ekspresyon seviyesi ile GdIgA1 düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir.

Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada da IgAN hasta grubunda COSMC mRNA düzeyi hasta yakını ve sağlıklı kontrollere göre daha düşük bulundu. Ayrıca COSMC mRNA düzeyi, ailesel IgAN olan ile olmayan grup karşılaştırıldığında da ailesel olanlarda belirgin olarak daha düşük bulundu. Bu bulgu, çalışmamızda ailesel IgAN hastalarında sporadiklere göre daha yüksek serum GdIgA1 düzeyini açıklar niteliktedir. Çalışmamız ailesel IgAN hastalarının COSMC mRNA seviyesi hakkında bilgi veren ilk çalışma olması açısından önemlidir fakat daha fazla hasta sayısının yer aldığı çalışmalarla desteklenmelidir.

IgAN hastalarında COSMC gen ekspresyon seviyesi ile şiddetli proteinüri arasında zayıf negative korelasyon bulunurken, hematüri ve serum kreatinin arasında korelasyon bulunmamıştır (171).

Çalışmamızda da benzer şekilde hastaların klinikopatolojik bulguları ile COSMC mRNA seviyesi arasında korelasyon bulunamamıştır. Bu bulgular, COSMC mRNA seviyesinin hastalığın tanısı için bir belirteç olabileceğini desteklerken, hastalığın prognozu hakkında bilgi verici nitelikte olmadığını düşündürmektedir. Bu düşüncemiz Moldoveanu ve ark.'larının (154) çalışmaları sonucunda bildirdikleri GdIgA1 düzeyinin prognozdan ziyade hastalık riski açısından önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği ifadeleri ile de örtüşmektedir.

COSMC gen ekspresyonunun regülasyonunda çeşitli ajanların rol oynadığını gösteren yayınlar bulunmaktadır (169,170). He ve ark.'ları (174) çocuk IgAN hastalarında, özellikle tonsilit gibi infeksiyonların proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak hastalığı indüklediğini belirtmiştir. Çalışmada bir inflamasyon sitokini olan IL-4 salınımının artması, COSMC mRNA seviyesinin düşmesine ve GdIgA1 seviyesinin de artmasına neden olabileceği yayınlamıştır. Yamada ve ark.'ları (175), IgAN hasta grubunda IL-4'ün IgA1 menteşe bölgesinin glikozilasyonunun regülasyonunda önemli rol oynayabileceğini bildirmiştir. Qin ve ark.'ları (92), IgAN hastalarında demetilasyon ajanı 5-Aza ile muamele edilen periferik B lenfositlerinde, DNA metilasyon modifikasyonunun COSMC gen ekspresyonunu önemli ölçüde düzenlendiğini göstermiştir. Xie ve ark.'ları (170), Asya IgAN hastalarında Lipopolisakkarit (LPS, gram (-) bakterilerin dış zarının ana bileşeni) gibi eksternal inhibitörlerin COSMC gen ekspresyon seviyesini düşürdüğünü, Mikofenolik Asit (MPA)'ın ise GdIgA1 seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Ji ve ark.'ları (169), Çin

tıbbında yaygın olarak kullanılan immün modüle edici bir bitki olan *Astagalus membranaceus* (AMI)'un IgAN hastalarının B lenfositinde IgA1 sekresyonunu inhibe ettiği bildirmiştir. Sun ve ark.'ları (148), COSMC geni promoter bölgesinin hipermetilasyonunun, IgAN hastalarının B lenfositlerinde COSMC mRNA ekspresyon düzeyinin düşmesi ve GdIgA1 seviyesindeki artış için önemli bir mekanizma olabileceğini ileri sürmüştür. Yaptıkları deneysel çalışmada da IgAN hastalarının B lenfositlerini IL-4 ile muamele ettiklerinde GdIgA1 seviyesinin arttığı, COSMC mRNA seviyesinin ise belirgin şekilde azaldığını bildirmiştir. İn vitro IL-4 tedavisinin, IgAN lenfositlerinde COSMC promoter metilasyonunu önemli ölçüde arttırırken, diğer böbrek hastalıkları ve sağlıklı kontrollerde bu artışın daha az olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda literatürle benzer şekilde IL-4 ile muamele edilen grupta COSMC mRNA seviyesi başlangıca göre belirgin olarak azalırken, GdIgA1 seviyesindeki ve genin promoter bölgesinin metilasyon oranındaki artış sınırlı kaldı. Hasta yakını ve sağlıklı kontrollerde IL-4 ile muamele edilen grupta COSMC mRNA seviyesinde bir değişiklik görülmedi.

Sun ve ark.'ları (148) yaptığı çalışmada özellikle hasta grubunda AZA (spesifik olmayan bir DNA metil transferaz inhibitörü) ile muamele edilen B lenfositlerinde COSMC promoter bölgesinin DNA metilasyonunun inhibe olduğunu gösterirken COSMC mRNA seviyesinin başlangıca göre arttığı, GdIgA1 düzeylerinin ise azaldığını göstermişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada da AZA ile muamele edilen lenfositlerin sonuçlarına bakıldığında literatürle tam uyumlu olduğu görüldü. IgAN lenfositlerinde AZA'dan sonra COSMC DNA metilasyon seviyesinde azalma diğer iki gruba göre daha belirgin oldu. Bu durum, IgAN hastalarında COSMC gen hipermetilasyonunun daha kolay demetile edilebilir ya da AZA'nın spesifik olmayan bir DNA metil transferaz inhibitörü olmasından dolayı çalışma grupları arasında farklılıklar oluşmasına neden olabilir şeklinde yorumlamamıza neden oldu. Hasta grubunun DNA metilasyon oranı diğerlerine göre daha yüksek olması nedeniyle demetilasyon hasta grubunda daha belirgin olabilir. Çalışmadaki grupların sayılarının oldukça düşük olması da gruplar arasında farklılık yaratıyor olabilir.

Bu tez çalışması, IgAN hastalarında DNA metilasyonunun deneysel modifikasyonlarının, COSMC mRNA ekspresyonu ve GdIgA1 düzeyi üzerine spesifik

bir davranış ortaya koyduğunu gösterdi. Ancak herhangi bir DNA metilasyon ya da demetilasyon ajanı ile muamele edilmemiş lenfositlerde COSMC geni DNA metilasyon seviyesinin kontrollerden farklı bulunmaması, DNA hipermetilasyonunun, azalmış COSMC mRNA ekspresyonuna neden olabileceği hipotezi ile tutarlı görülmemektedir. Bunun nedeni çalışma grubunun yeterince büyük olmaması ve çalışmadaki hasta grubunun tüm hasta popülasyonunu temsil etmemesi olabilir. COSMC gen promoter bölgesinin CpG adalarının bazı anahtar alanlarındaki aşırı metilasyon, COSMC geni DNA'sının statüsünü değiştirmede belirleyici bir rol oynayabilir ve sonuç olarak COSMC mRNA ekspresyonunu değiştirebilir. Bu çalışmada, COSMC gen promoter bölgesinin tamamının DNA metilasyonu analiz edilmiş olup bölgesel metilasyon oranları hakkında bilgi sahibi olunamamıştır. Ayrıca çalışmanın in vitro koşullarda gerçekleştirilmesi genin metilasyon profilini değiştiriyor olabileceğinden, çıkan sonuçların geniş popülasyonlu in vivo çalışmalarla tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır.

IgAN'nin tanısının sadece böbrek biyopsisi ile konulabiliyor olması, tanı ve takip için iyi bir değerlendirme kriterinin belirlenme ihtiyacını doğurmuştur. Fakat henüz IgAN tanı, izleme ve prognoz kararına uygun bir indeks bulunmamaktadır. Proteinürinin şiddeti, hematüri, hipertansiyon, ödem ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi klasik indeksler duyarlılık ve özgüllük açısından yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, invaziv bir işlem olan böbrek biyopsisi, hastalık ilerlemesinin sürekli izlenmesi için uygun değildir. Bulgularımız, COSMC mRNA ekspresyon seviyesi ile serum GdIgA1 düzeyinin, IgAN hastalarını izlemede bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürerken, bu varsayımı doğrulamak için geniş çaplı ve uzun süreli bir klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Berger J, Hinglais N. Intercapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol*. 1968;**74**:694-5.
2. Lai KN, Tang SC, Schena FP, Novak J, Tomino Y, Fogo AB et al. IgA nephropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;**11**;2:16001.
3. Chailimpamontree W, Dmitrienko S, Li G, Balshaw R, Magil A, Shapiro RJ, Landsberg D et al. Probability, predictors, and prognosis of posttransplantation glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009;**20**: 843–851.
4. Tam KY, Leung JC, Chan LY, Lam MF, Tang SC, Lai KN. Macromolecular IgA1 taken from patients with familial IgA nephropathy or their asymptomatic relatives have higher reactivity to mesangial cells *in vitro*. *Kidney Int*. 2009;**75**: 1330–1339.
5. Bisceglia L, Cerullo G, Forabosco P, Torres DD, Scolari F, Di Perna M et al. Genetic heterogeneity in Italian families with IgA nephropathy: suggestive linkage for two novel IgA nephropathy loci. *Am. J. Hum. Genet*. 2006;**79**:1130–1134.
6. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J. et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat. Genet*. 2011;**43**: 321–327.
7. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS Genet*. 2012; **8**: e1002765.
8. Yu XQ, Li M, Zhang H, Low HQ, Wei X, Wang JQ. et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat. Genet*. 2011;**44**:178–182.
9. Woo KT, Chan CM, Mooi CY, -L-Choong H, Tan HK, Foo M. et al. The changing pattern of primary glomerulonephritis in Singapore and other countries over the past 3 decades. *Clin. Nephrol*. 2010;**74**:372–383.
10. Ozturk S, Sumnu A, Seyahi N, Gullulu M, Sipahioglu M, Artan S. Demographic and clinical characteristics of primary glomerular diseases in Turkey. *Int Urol Nephrol*. 2014; **46**:2347–2355.

11. Khalifa EH, Kaballo BG, Suleiman SM, Khalil EA, El-Hassan AM. Pattern of glomerulonephritis in Sudan: histopathological and immunofluorescence study. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 2004;**15**:176–179.
12. Wyatt RJ, Julian BA, Baehler RW, Stafford CC, McMorro RG, Ferguson T. et al. Epidemiology of IgA nephropathy in central and eastern Kentucky for the period 1975 through 1994. Central Kentucky Region of the Southeastern United States IgA Nephropathy DATABANK Project. *J.Am.Soc Nephrol.* 1998;**9**:853-8.
13. Sissons JG, Woodrow DF, Curtis JR, Evans DJ, Gower PE, Sloper JC. et al. Isolated glomerulonephritis with mesangial IgA deposits. *Br. Med. J.* 1975;**3**, 611–614.
14. Power DA, Muirhead N, Simpson JG, Nicholls AJ, Horne CH, Catto GR. et al. IgA nephropathy is not a rare disease in the United Kingdom. *Nephron.* 1985;**40**:180–184.
15. Liu H, Peng Y, Liu H, Liu Y, Yuan S, Liu F. et al. Renal biopsy findings of patients presenting with isolated hematuria: disease associations. *Am. J. Nephrol.* 2012;**36**: 377–385.
16. Kiryluk K, Novak J, Gharavi AG. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies. *Annu. Rev. Med.* 2013;**64**:339–356.
17. Yokoyama H, Sugiyama H, Sato H, Taguchi T, Nagata M, Matsuo S. et al. Renal disease in the elderly and the very elderly Japanese: analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR). *Clin. Exp. Nephrol.* 2012;**16**: 903–920.
18. Schena FP. A retrospective analysis of the natural history of primary IgA nephropathy worldwide. *Am. J. Med.* 1990; **89**:209–215.
19. Shen P, Ding X, Ten J, Ji J, Zou J, Fang Y. Clinicopathological characteristics and outcome of adult patients with hematuria and/or proteinuria found during routine examination. *Nephron Clin. Pract.* 2006;**103**:149–156.
20. Yel L. Selective IgA Deficiency. *J Clin Immunol.*2010; 30: 10–16.
21. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol.* 2006; **208**:270–82.
22. Corthésy B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol.* 2007;**178**:27–32.
23. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med.* 1990;**171**:597–613.

24. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med.* 1987;**106**:892–9.
25. Russell MW, Sibley DA, Nikolova EB, Tomana M, Mestecky J. IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem Soc Trans.* 1997;**25**:466–70.
26. Mestecky J, Russell MW. Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview. *Biochem Soc Trans.* 1997;**25**:457–62.
27. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008;**1**:11–22.
28. Tanaka A, Iwase H, Hiki Y, Kokubo T, Ishii-Karakasa I, Toma K, et al. Evidence for a site specific fucosylation of N-linked oligosaccharide of immunoglobulin A1 from normal human serum. *Glycoconj J.* 1998;**15**:995–1000.
29. Gomes MM, Wall SB, Takahashi K, Novak J, Renfrow MB, Herr AB. Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to Fc α RI binding. *Biochemistry.* 2008;**47**:11285–99.
30. Tabak LA. The role of mucin-type O-glycans in eukaryotic development. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; **21**:616–21.
31. Gerken TA, Jamison O, Perrine CL, Collette JC, Moinova H, Ravi L, et al. Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 2011;**286**:14493–507.
32. Knoppova B, Reily C, Maillard N, Rizk DV, Moldoveanu Z, Mestecky J, et al. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front. Immunol.* 2016;**7**:117.
33. Reily C, Ueda H, Huang ZQ, Mestecky J, Julian BA, Willey CD et al. Cellular Signaling and Production of Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy, an Autoimmune Disease. *J Immunol Res.* 2014;**2014**:197548-58.
34. Davin JC, Coppo R. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children. *Nat Rev Nephrol.* 2014;**10**:563-73.
35. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011;**22**, 1795–1803.
36. Glassock, R. J. The pathogenesis of IgA nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2011;**20**, 153–160.

37. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest.* 2008;**118**:629–39.
38. Tomana M, Matousovic K, Julian BA, Radl J, Konecny K, Mestecky J. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int.* 1997; **52**:509–16. doi:10.1038/ki.1997.361.
39. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *J Clin Immunol.* 2001;**21**:310–27. doi:10.1023/A:1012284402054.
40. Raska M, Yamada K, Horynova M, Takahashi K, Suzuki H, Moldoveanu Z, et al. Role of GalNAc-transferases in the synthesis of aberrant IgA1 O-glycans in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011;**22**:625.
41. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian BA, Wyatt RJ, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem.* 2014;**289**:5330–9.
42. Szeto CC, Li PK. MicroRNAs in IgA nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014;**10**, 249–256.
43. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Kiryluk K, Gharavi AG, Matsuoka K, et al. A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. *PLoS One.* 2014;**9**:98081. doi:10.1371/journal.pone.0098081.
44. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest.* 2009;**119**:1668–77.
45. Huang ZQ, Raska M, Stewart T, Reily C, King RG, Crossman DK, et al. Somatic mutations modulate autoantibodies against galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2016;**27**:3278–3284.
46. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest.* 1999;**104**:73–81.
47. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C. et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012;**23**, 1579–1587.
48. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V. et al. Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015;**26**, 1503–1512.

49. Novak J, Mestecky J. IgA immune-complex. Lai KN, editor. *Recent Advances in IgA Nephropathy*. Hong Kong: Imperial College Press and the World Scientific Publisher;2009. p. 177–91.
50. Novak J, Raska M, Mestecky J, Julian BA. IgA nephropathy and related diseases. 4th edition. In: Mestecky J, Strober W, Russell MW, Kelsall BL, Cheroute H, Lambrecht BN, editors. *Mucosal Immunology*. Amsterdam: Elsevier/ Academic Press;2015. p. 2023–38.
51. Kiryluk K, Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy. *N Engl J Med*. 2013;**368**:2402–14.
52. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Kidney Int*. 2011;**80**:79–87.
53. Levinsky RJ, Barratt TM. IgA immune complexes in Henoch-Schönlein purpura. *Lancet*.1979;**2**:1100–3.
54. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Horii A, Tanaka A, Nishikido J, et al. Evidence for involvement of IgA1 hinge glycopeptide in the IgA1–IgA1 interaction in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1997; **8**: 915–19.
55. Mestecky J, Raska M, Julian BA, Gharavi AG, Renfrow MB, Moldoveanu Z. et al. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease. *Annu. Rev. Pathol*. 2013;**8**:217–240.
56. Lai KN, Leung JC, Chan LY, Saleem MA, Mathieson PW, Lai FM, et al. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF- α : glomerulo–podocytic communication in IgA nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2008;**294**:945– 55.
57. Chan LY, Leung JC, Tang SC, Choy CB, Lai KN. Tubular expression of angiotensin II receptors and their regulation in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005;**16**:2306–2317.
58. Wagner J, Gehlen F, Ciechanowicz A, Ritz E. Angiotensin II receptor type 1 gene expression in human glomerulonephritis and diabetes mellitus. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1999;**10**:545–551.
59. Kiryluk K. and Novak J. The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J. Clin. Invest*. 2014;**124**, 2325–2332.
60. Yan Y, Xu LX, Zhang JJ, Zhang Y, Zhao MH. Self-aggregated deglycosylated IgA1 with or without IgG were associated with the development of IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol*. 2006; **144**:17–24.

61. Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Nagai-Hosoe Y, Seki T, *et al.* Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2012;**7**, 1385–1393.
62. Hishiki T, Shirato I, Takahashi Y, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y. Podocyte injury predicts prognosis in patients with IgA nephropathy using a small amount of renal biopsy tissue. *Kidney Blood Press. Res.* 2001;**24**:99–104.
63. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, *et al.* Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2002;**61**, 1475–1485.
64. Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H *et al.* Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013;**28**:1762–1772.
65. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society¹, Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, *et al.* The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int.* 2009;**76**:534–545.
66. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, *et al.* The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009; **76**:546–556.
67. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Coppo R, Troyanov S, Camilla R, Hogg RJ, Cattran DC, *et al.* The Oxford IgA nephropathy clinicopathological classification is valid for children as well as adults. *Kidney Int.* 2010; **77**:921–927.
68. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Cook HT, Feehally J, *et al.* Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney Int.* 2014;**86**:828–836.
69. Bellur SS, Troyanov S, Cook HT, Roberts IS. Immunostaining findings in IgA nephropathy: correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohort. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;**26**:2533–2536.
70. Roberts IS. Oxford classification of immunoglobulin A nephropathy: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;**22**:281–286.

71. Zeng CH, Le W, Ni Z, Zhang M, Miao L, Luo P, et al. A multicenter application and evaluation of the Oxford Classification of IgA nephropathy in adult Chinese patients. *Am J Kidney Dis*. 2012; **60**:812–820.
72. Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone COSMC required for activity of the mammalian core 1 β -galactosyltransferase. *PNAS*. 2002;**24**:16613-8.
73. Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA*. 2016;**88**:275–286.
74. Lira-Navarrete E, de Las Rivas M, Compañón I, Pallarés MC, Kong Y, Iglesias-Fernández J. et al. Dynamic interplay between catalytic and lectin domains of GalNAc-transferases modulates protein O-glycosylation. *Nat Commun*. 2015;**6**: 6937.
75. Karsten U and Goletz S. What controls the expression of the core-1 (Thomsen-Friedenreich) glycotope on tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2015;**80**: 801–7.
76. Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K, Huflejt ME, Glinskii OV, Deutscher SL, et al. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res*. 2001;**61**: 4851–7.
77. Bian CF, Zhang Y, Sun H, Li DF, Wang DC. Structural basis for distinct binding properties of the human galectins to Thomsen-Friedenreich antigen. *PLoS One*. 2011;**6**:25007.
78. Aryal RP, Ju T, Cummings RD. The endoplasmic reticulum chaperone COSMC directly promotes in vitro folding of T-synthase. *J Biol Chem*. 2010;**285**:2456–62.
79. Narimatsu Y, Kubota T, Furukawa S, Shimojima M, Iwasaki H, Tozawa Y, et al. Co-translational function of COSMC, core 1 synthase specific molecular chaperone, revealed by a cell-free translation system. *FEBS Lett*. 2011;**585**: 1276–80.
80. Aryal RP, Ju T, Cummings RD. Identification of a novel protein binding motif within the T-synthase for the molecular chaperone COSMC. *J Biol Chem*. 2014; **289**: 11630–41.
81. Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011; **50**: 1770–91.
82. Mi R, Song L, Wang Y, Ding Y, Zeng J, Lehoux S, et al. Epigenetic Silencing of the Chaperone COSMC in Human Leukocytes Expressing Tn Antigen. *J Biol Chem*. 2012;**287**:41523–41533.

83. Ju T, Brewer K, D'Souza A, Cummings RD, Canfield W M. Cloning and expression of human core 1 α -1,3-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**:178–186.
84. Xia L, Ju T, Westmuckett A, An G, Ivanciu L, McDaniel JM, et al. Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *J. Cell Biol.* 2004;**164**:451–459.
85. Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, Xia L, et al. COSMC is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;**107**:9228–9233.
86. Ju T, Aryal RP, Kudelka MR, Wang Y, Cummings RD. The COSMC connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomark.* 2014;**14**: 63–81.
87. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, et al. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in COSMC. *Cancer Res.* 2008;**68**:1636–1646.
88. Berger EG. Tn-syndrome. *Biochim. Biophys.* 1999;**1455**:255–268.
89. Mestecky J, Tomana M, Moldoveanu Z, Julian BA, Suzuki H, Matousovic K, et al. Role of aberrant glycosylation of IgA1 molecules in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Kidney Blood Press.* 2008;**31**:29–37.
90. Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science.* 1984;**224**:1198–1206.
91. Crew VK, Singleton BK, Green C, Parsons SF, Daniels G, Anstee DJ. New mutations in C1GALT1C1 in individuals with Tn positive phenotype. *Br. J. Haematol.* 2008;**142**:657–667.
92. Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation: Chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature.* 2005;**437**:1252.
93. Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, Meredith SC, et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science.* 2006; **314**: 304–308.
94. Thurnher M, Rusconi S, Berger EG. Persistent repression of a functional allele can be responsible for galactosyltransferase deficiency in Tn syndrome. *J. Clin. Invest.* 1993;**91**: 2103–2110.
95. Felner KM, Dinter A, Cartron JP, Berger EG. Repressed α -1,3-galactosyltransferase in the Tn syndrome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;**1406**: 115–125.

96. Qin W, Zhong X, Fan JM, Liu XR, Li Z, Ma XY. Effect of methylation modification on the expression of COSMC gene in peripheral B lymphocyte of IgA nephropathy patients nephropathy patients. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011; **42**:762–765.
97. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013; **14**: 204-20.
98. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; **99**: 3740-5.
99. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; **16**: 6-21.
100. Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*. 2011; **12**: 647-56.
101. Lodish H. Gen İfadesinin Transkripsiyonel Kontrolü. Prof.Dr. Hikmet Geçkil, çeviri editörü. *Moleküler Hücre Biyolojisi*. Ankara:Palme Yayıncılık; 2011. pp. 269-322.
102. Rodenheiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006; **174**: 341-8.
103. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour*. 1942; **1**: 18-20.
104. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007; **447**: 396-8.
105. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 2011; **21**:381-395.
106. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; **4**:143-153.
107. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; **51**:786-794.
108. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; **389**:251-260.
109. Xhemalce B, Dawson MA, Bannister AJ. Histone modifications. Meyers R, editör. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. John Wiley and Sons; 2011.

110. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 2007; **26**:5310-5318.
111. Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;**44**: 14–27.
112. Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;**16**:258–264.
113. Andrew J Bannister¹, Tony Kouzarides. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 201;**21**(3):381–395.
114. Oki M, Aihara H, Ito T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem*. 2007; **41**:319-336.
115. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005;**41**:2381-402.
116. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; **67**:425-479.
117. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004; **431**:873-878.
118. Lee JS, Shukla A, Schneider J, et al. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*. 2007; **131**:1084-1096.
119. Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, et al. RAD6-mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 2009; **137**:459-471.
120. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**:13225-13230.
121. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; **70**:789-829.
122. Morin V, Diaz F, Montecino M, Fothergill-Gilmore L, Puchi M, Imschenetzky M. Poly (ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Biochem J*. 1999;**343**:95-8.

123. Sakabe K, Wang Z, Hart GW. {beta}-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci* .2010; **107**:19915-19920.
124. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007; **7**: 823-833.
125. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; **128**:693-705.
126. Conerly M, Grady WM. Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. *Dis Model Mech*. 2010;**3**:290-297.
127. Tang L, Nogales E, Ciferri C. Structure and Function of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Mechanistic Implications for Transcription. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010; **102**: 122–128.
128. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. 2001;**15**:2343-2360.
129. Mohrmann L, Verrijzer CP. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2005;**1681**:59–73.
130. Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin J, Maltais LJ. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*. 2002; **80**:487-498.
131. Bonisch C, Nieratschker SM, Orfanos NK, Hake SB. Chromatin proteomics and epigenetic regulatory circuits. *Expert Rev Proteomics*. 2008; **5**:105-119.
132. Zink LM, Hake SB. Histone variants: nuclear function and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2016; **37**:82–89.
133. Monteiro FL, Baptista T, Amado F, Vitorino R, Jeronimo C, Helguero LA. Expression and functionality of histone H2A variants in cancer. *Oncotarget*. 2014; **5**:3428-3443.
134. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014; **9**: 3–12.
135. Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today*. 2007;**43**:395–422.
136. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001;**20**:3139–55.
137. Subramaniam D, Thombre Z, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*. 2014;**4**: 80.

138. Samir Zakhari. Alcohol Metabolism and Epigenetics Chang. *Alcohol Res.* 2013; **35**: 6-16.
139. Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature.* 2008;**6**:452:45-50.
140. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;**196**:1-7.
141. Güler C, Peynircioğlu BB. DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi. *ACU Sağlık Bil Derg.* 2016;**2**: 61-68.
142. Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. *Blood.* 1999; **93**: 4059-4070.
143. Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 1992;**11**:327.
144. Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan X, Jeppesen P, Bird A. Transcriptional repression by methylation of CpG. *J Cell Sci Suppl.* 1992;**16**:9.
145. Tate P, Skarnes W, Bird A. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet.* 1996;**12**:205.
146. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 1997;**88**:471.
147. Wu X, Tschumper RC, Gutierrez A Jr, Mihalcik SA, Nowakowski GS, Jelinek DF. Selective induction of DNA repair pathways in human B cells activated by CD4+ T cells. *PLoS One.* 2010;**5**:15549.
148. Sun Q, Zhang J, Zhou N, Liu X, Shen Y. DNA Methylation in COSMC Promoter Region and Aberrantly Glycosylated IgA1 Associated with Pediatric IgA Nephropathy. *PLoS One.* 2015;**10**: 0112305.
149. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;**25**:402-8.
150. Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* 2007;**6**:50-59.
151. Yasutake J, Suzuki Y, Suzuki H, Hiura N, Yanagawa H, Makita Y, et al. Novel lectin-independent approach to detect galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;**30**:1315-21.
152. Thomas Rauen & Jürgen Floege. Inflammation in IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2017. doi:10.1007/s00467-017-3628-1.

153. Maixnerova D, Reily C, Bian Q, Neprasova M, Novak J, Tesar V. Markers for the progression of IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2016;**29**:535-41.
154. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, Tomana M, Julian BA, Mestecky J, et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney Int*. 2007;**71**: 1148–1154.
155. Shimozato S, Hiki Y, Odani H, Takahashi K, Yamamoto K, Sugiyama S: Serum under-galactosylated IgA1 is increased in Japanese patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;**23**: 1931–1939.
156. Gale DP, Molyneux K, Wimbury D, Higgins P, Levine AP, Caplin B, et al. Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1. *J Am Soc Nephrol*. 2017. pii: ASN.2016091043. doi: 10.1681/ASN.2016091043. [Epub ahead of print]
157. Sun Q, Zhang Z, Zhang H, Liu X. Aberrant IgA1 Glycosylation in IgA Nephropathy: A Systematic Review. *PLoS One*. 2016;**21**:11(11):e0166700. doi: 10.1371/journal.pone.0166700.
158. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Barker CV, Woodford SY, Lifton RP, et al. Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;**5**:1008-1014.
159. Hastings MC, Moldoveanu Z, Julian BA, Novak J, Sanders JT, McGlothlan KR, et al. Galactose-Deficient IgA1 in African Americans with IgA Nephropathy: Serum Levels and Heritability. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;**11**:2069-2074.
160. Lin X, Ding J, Zhu L, Shi S, Jiang L, Zhao M, et al. Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;**24**: 3372–3375.
161. Irjala K, Koskinen P, Icen A, Palosuo T. Reference intervals for immunoglobulins IgA, IgG and IgM in serum in adults and in children aged 6 months to 14 years. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990; **50**:573–577.
162. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, et al. Aberrant Glycosylation of IgA1 is Inherited in Pediatric IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. *Kidney Int*. 2011; **80**: 79–87.
163. Camilla R, Suzuki H, Daprà V, Loiacono E, Peruzzi L, Amore A, et al. Oxidative stress and galactose-deficient IgA1 as markers of progression in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;**6**: 1903–1911.
164. Hastings MC, Afshan S, Sanders JT, et al. Serum Galactose-Deficient IgA1 Level Is Not Associated with Proteinuria in Children with IgA Nephropathy. *Int J Nephrol*.. 2012;**2012**:315467.

165. Coppo R, Amore A. Aberrant glycosylation in IgA nephropathy (IgAN). *Kidney Int.*2004; **65**: 1544-1547.
166. Zhao N, Hou P, Lv J, Moldoveanu Z, Li Y, Kiryluk K, et al. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney Int.* 2012; **82**: 790±6.
167. Jiang M, Jiang X, Rong L, Xu Y, Chen L, Qiu, Mo Y. Serum galactose-deficient IgA1 levels in children with IgA nephropathy. *Int J Clin Exp Med.* 2015;**8(5)**:7861-7866.
168. Eison TM, Hastings MC, Moldoveanu Z, Sanders JT, Gaber L, Walker PD, et al. Association of IgG co deposition with serum levels of galactose deficient IgA1 in pediatric IgA nephropathy. *Clin Nephrol.* 2012;**78(6)**:465-9.
169. Ji L, Chen X, Zhong X, Li Z, Yang L, Fan J, et al. Astragalus membranaceus up-regulate COSMC expression and reverse IgA dysglycosylation in IgA nephropathy. *BMC Complement Altern Med.*2014;**14**:195.
170. Xie L, Tan C, Fan J, Fu P, Tang Y, Tao Y, et al. Mycophenolic acid reverses IgA1 aberrant glycosylation through up-regulating COSMC expression in IgA nephropathy. *Int Urol Nephrol.* 2013;**45**:571–579.
171. Qin W, Zhou Q, Yang LC, Li Z, Su BH, Luo H, et al. Peripheral B lymphocyte beta1,3-galactosyltransferase and chaperone expression in immunoglobulin A nephropathy. *J Intern Med.*2005;**258**:467–477.
172. Qin W, Zhong X, Fan JM, Zhang YJ, Liu XR, Ma XY. External suppression causes the low expression of the COSMC gene in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;**23**:1608–1614.
173. Shao J, Peng Y, He L, Liu H, Chen X, Peng X. Capsaicin induces high expression of BAFF and aberrantly glycosylated IgA1 of tonsillar mononuclear cells in IgA nephropathy patients. *Hum Immunol.*2014; **75**:1034–1039.
174. He L, Peng Y, Liu H, Yin W, Chen X, Peng X, et al. Activation of the interleukin-4/signal transducer and activator of transcription 6 signaling pathway and homeodomain-interacting protein kinase 2 production by tonsillar mononuclear cells in IgA nephropathy. *Am J Nephrol.* 2013;**38**: 321–332.
175. Yamada K, Kobayashi N, Ikeda T, Suzuki Y, Tsuge T, Horikoshi S, et al. Down-regulation of core 1 β 1,3-galactosyltransferase and COSMC by Th2 cytokine alters O-glycosylation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;**25**:3890-7.

HAM VERILER

mRNA (ΔCt)						
Hasta No	Grup I GAPDH	Grup I COSMC	Grup II GAPDH	Grup II COSMC	Grup III GAPDH	Grup III COSMC
1	32,56	38	29,09	38	35,15	38
2	26,61	31,52	28,53	33,8	31,46	38
3	22,12	27,84	23,57	27,69	20,68	26,27
4	21,38	23,91	28,45	31,68	30,15	31,94
5	28,27	31,87	27,7	34,38	28,42	30,81
6	28,27	28,19	26,85	30,52	30,1	38
7	28,67	32,1	29,72	38	30,95	32,23
8	29,63	38	29,31	33,06	30,47	32,98
9	30,3	38	25,88	38	36,46	38
10	25,62	29,92	29,06	34,12	34,13	38
11	29,55	34,61	29,34	31,71	32,99	38
12	28,85	38	30,04	34,14	31,34	30,35
13	24,5	28,29	28,67	37,35	25,27	29,58
14	29,36	31,13	30,77	33,22	32,17	32,38
15	30,4	38	32,9	38	32,1	38
16	21,58	26,82	29,08	32,93	24,78	30,06
17	28,75	31,02	27,31	38	30,02	32,8
18	28,05	31,71	28,6	29,99	29,48	38
19	28,76	38	28,06	33,9	27,62	31,48
20	30,77	38	31,81	38	30,53	32,89
21	29,75	35,71	25,01	33,27	32,15	35,8
22	28,77	34,42	28,54	33,96	34,67	38
23	29,71	38	28,21	30,19	30,08	33,98
24	28,66	30,77	29,35	38,00	30,42	33,14
25	27,8	29,27	27,87	32,02	30,66	33,29
26	21,96	28,89	24,56	30,18	21,85	28,62
27	20,54	26,02	21,94	26,84	21,58	27,15
28	28,45	30,12	20,81	30,95	31,03	32,23
29	29,76	35,98	31,9	38	33,29	38
30	30,26	38	31,09	38	30,68	38
Hasta yakını						
1	30,97	37,14	31,24	36,975	26,67	34,77
2	28,89	32,85	30,37	35,12	26,15	30,79
3	33,82	33,91	32,71	35,54	34,82	34,32
4	28,02	30,465	28,96	35,615	30,1	33,75
5	36,22	38	34,595	36,06	32,925	34,885

6	30,62	36,155	33,3	33,65	30,73	32,205
7	25,07	28,74	27,56	31,24	23,52	28,275
8	29,71	34,545	29,035	33,12	32,53	34,5
9	29,735	38	29,82	38	28,23	35,04
10	27,765	34,045	30,52	36,39	28,795	34,525
11	30,265	34,525	32,305	38	32,025	38
Sağlıklı kontrol						
1	27,625	33,805	24,4	29,295	28,715	34,53
2	33,88	34	28,42	29,28	30,07	29,78
3	29,62	35,88	29,21	33,785	26,94	34,455
4	31,69	35,74	30,6	38	30,93	35,33
5	31,75	33,05	29,75	34,36	31,37	36,64
6	25,22	33,33	29,75	34,9	31,37	34,05

DNA Metilasyon Sonuçları						
Hasta No	Grup I Unmetilasyon	Grup II Unmetilasyon	Grup III Unmetilasyon	Grup I Metilasyon	Grup II Metilasyon	Grup III Metilasyon
1	36,35%	41,75%	44,14%	63,65%	58,25%	55,86%
2	100,00%	100,00%	99,97%	0,00%	0,00%	0,03%
3	100,00%	100,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4	84,72%	50,00%	38,16%	15,28%	50,00%	61,84%
5	36,35%	41,75%	44,14%	63,65%	58,25%	55,86%
6	8,71%	7,98%	30,70%	91,29%	92,02%	69,30%
7	36,60%	5,88%	50,03%	63,40%	94,12%	49,97%
8	24,19%	0,14%	46,02%	75,81%	99,86%	53,98%
9	41,15%	91,92%	93,39%	58,85%	8,08%	6,61%
10	26,26%	16,63%	44,59%	73,74%	83,37%	55,41%
11	81,79%	0,18%	76,71%	23,29%	99,82%	18,21%
12	33,45%	30,99%	38,69%	66,55%	69,01%	61,31%
13	100,00%	99,91%	99,96%	0,00%	0,09%	0,04%
14	100,00%	22,86%	44,75%	0,00%	77,14%	55,25%
15	8,08%	100,00%	100,00%	91,92%	0,00%	0,00%
16	16,00%	5,87%	64,89%	84,00%	94,13%	35,11%
17	2,84%	0,00%	95,99%	97,16%	100,00%	4,01%
18	1,67%	0,09%	53,99%	98,33%	99,91%	46,01%
19	0,00%	0,00%	0,22%	100,00%	100,00%	99,78%
20	37,63%	23,49%	38,46%	62,37%	76,51%	61,54%
21	0,00%	0,00%	0,01%	100,00%	100,00%	99,99%

22	0,01%	0,00%	0,11%	99,99%	100,00%	99,89%
23	0,00%	0,00%	0,09%	100,00%	100,00%	99,91%
24	2,38%	0,02%	72,06%	97,62%	99,98%	27,94%
25	99,42%	95,81%	99,84%	0,58%	4,19%	0,16%
26	89,95%	91,37%	99,88%	10,05%	8,63%	0,12%
27	34,01%	43,23%	43,28%	65,99%	56,77%	56,72%
28	99,99%	37,24%	39,53%	0,01%	62,76%	60,47%
29	91,59%	93,87%	99,99%	8,41%	6,13%	0,01%
30	99,98%	98,90%	99,68%	0,02%	1,10%	0,32%
Hasta yakını						
1	36,11%	25,72%	41,20%	63,89%	74,28%	58,80%
2	100,00%	99,97%	99,79%	0,00%	0,03%	0,21%
3	96,15%	99,94%	99,51%	3,85%	0,06%	0,49%
4	87,14%	83,82%	89,43%	12,86%	16,18%	10,57%
5	26,81%	21,78%	82,82%	73,19%	78,22%	17,18%
6	99,55%	48,02%	97,88%	0,45%	51,98%	2,12%
7	38,16%	20,59%	39,87%	61,84%	79,41%	60,13%
8	93,54%	20,59%	95,06%	6,46%	6,65%	4,94%
9	19,90%	17,75%	86,89%	81,10%	82,25%	13,11%
10	89,44%	100,00%	25,53%	10,56%	0,00%	74,47%
11	46,03%	10,10%	84,69%	53,97%	89,90%	15,31%
Sağlıklı kontrol						
1	26,79%	37,37%	35,36%	73,21%	62,63%	64,64%
2	28,92%	25,00%	42,04%	71,08%	75,00%	57,96%
3	67,01%	16,15%	67,45%	32,99%	83,85%	32,55%
4	100,00%	92,11%	100,00%	0,00%	7,89%	0,00%
5	100,00%	98,41%	99,81%	0,00%	1,59%	0,19%
6	64,40%	55,56%	75,46%	44,44%	35,60%	24,54%

GdIgA1 Düzeyi (ng/μL)				
Hasta No	Grup I Süpernatant	Grup II Süpernatant	Grup III Süpernatant	Serum
1	8,3	11,9	1,8	21963,7
2	4,2	1,7	1,3	3685,9
3	6,6	2,5	7,6	9930,2
4	7,8	28,2	7,0	8597,7
5	21,6	24,7	6,7	9739,8
6	11,5	14,5	8,2	11706,9
7	3,6	3,6	2,2	5956,2
8	57,8	4,6	14,1	17074,1
9	5,4	65,1	1,9	6662,4
10	5,5	6,3	1,8	5769,2

11	9,9	25,0	3,0	9264,0
12	14,7	22,9	7,6	22594,6
13	7,1	15,2	5,1	8058,4
14	124,1	206,2	80,2	32728,7
15	3,2	3,4	2,2	3685,9
16	4,9	4,0	5,7	4861,1
17	6,8	18,2	13,2	6789,3
18	7,1	6,1	2,7	8788,1
19	6,4	4,4	3,9	7899,7
20	4,1	2,4	4,2	2827,4
21	1,9	2,55	1,5	20489,1
22	21,2	6,35	6,2	6142,9
23	155,9	184,2	56,3	28894,1
24	19,2	20,1	9,7	2888,3
25	48,9	44,6	27,8	6702,1
26	5,3	5,8	1,5	3996,1
27	12,7	14,0	2,5	11678,2
28	1,7	4,2	1,4	2306,5
29	7,2	9,5	3,55	2187,5
30	1,21	1,32	1,34	2845,1
Hasta yakını				
1	2,03	2,23	2,18	2525,8
2	1,92	12,57	2,38	1499,0
3	4,3	4,1	1,7	1073,4
4	18,6	18,3	5,6	11403,7
5	7,7	5,7	1,4	1779,0
6	1,9	6,2	1,1	901,9
7	8,4	8,8	1,9	5448,0
8	2,3	2,5	1,3	3373,9
9	2,6	3,4	1,6	2663,0
10	2,1	2,9	1,13	2812,5
11	2,52	2,92	1,24	4189,9
Sağlıklı kontrol				
1	28,5	38,5	14,5	5461,8
2	23,7	22,2	6,53	1222,8
3	1,53	1,56	,87	1242,9
4	1,06	,97	,98	947,0
5	1,29	1,28	1,00	1514
6	4,97	5,82	2,80	4032,8

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1564

Konu : Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ

Tarih : 21.08.2015

Sayın Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İlgi : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının 07/07/2015 gün ve 214992 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Bio. Sebahat AKGÜL' ün yürüteceği 2015/1506 dosya numaralı "IgA Nefropatisinde Cosmc Geni DNA Metilasyon Profili ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 14/08/2015 tarih ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"IgA Nefropatisinde Cosmc Geni DNA Metilasyon Profili ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	11/08/2015		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13	Tarih: 14/08/2015	
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ' un sorumluluğunda ve Bio. Sebahat AKGÜL' ün yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLİ
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	KATILMADI
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	KATILMADI
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığının izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEBAHAT	Soyadı	AKGÜL
Doğ.Yeri	ARAÇ	Doğ.Tar.	09.10.1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	29755982928
Email	sebahatakul@gmail.com	Tel	5332305090

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyoloji	
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyoloji	2010
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji	2004
Lise	Safranbolu Lisesi	1995

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İstanbul Tıp Fakültesi	2005-
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	orta	55	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office word	Çok İyi
Microsoft office excel	Çok iyi
Microsoft office power point	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ödüller

- 2017 6. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi
En iyi poster bildiri ödülü
‘Gebeliğin Anti-HLA Antikor Profili Üzerine Etkisi’
- 2016 Türk Nefroloji Derneği 33. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi
En iyi sözlü bildiri birincilik ödülü
‘IgA Nefropatisi için Yeni Serolojik ve Genetik Biyobelirteç: Galaktozillenmesi Yetersiz IgA1 Düzeyi ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri’
- 2016 TONKKD XI. Kongresi
En iyi sözlü bildiri ödülü
‘Türk Populasyonunda Hipersensitize hastaların Hesaplamalı Sanal PRA-CPRA ile Düzeltilmiş PRA Oranları’
- 2016 TONKKD XI. Kongresi
En iyi poster bildiri ödülü
‘Post-transplant IgA nefropati nüksü tanı ve hastalık aktivitesinin değerlendirmesinde yeni bir biyo-belirteç: galaktozillenmesi yetersiz IgA1 düzeyi’
- 2014 8. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök hücre tedavileri kongresi
Poster 2’lik ödülü
“Allogeneik kök hücre nakli sonrası anti-HLA ve anti-GSTT1 antikorlarının nakil başarısı üzerine etkisi”
- 2012 TONKKD IX. Kongresi
En iyi poster bildiri ödülü
“Uzun dönem renal allograft sağkalımı üzerine HLA, MICA ve GSTT1 antikorlarının etkisi”

Burslar

2012 Classic and Modern Methods for Molecular Diagnostics in Human Patolgy, Lifelong Learning Programme 11-EIP-RO Brasov 01, 14-25 Mayıs 2012, Romanya

Kurslar

2016 TONKKD Organ Nakli İmmünoloji Kursu
Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği XI. Kongrei
13-15 Ekim 2016, Konya-Türkiye

2015 I. HLA Günleri Crossmatch Kursu, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. 27-31 Mayıs 2013, İstanbul

2014 TONKKD-TİGED ORTAK İMMÜNOLOJİ KURSU
Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği X. Kongresi
15 Ekim 2014, Bodrum-Türkiye

2013 Cross-Match Kursu, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.
27-31 Mayıs 2013, İstanbul

2012 XVIII.Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi
4-8 Haziran 2012, İstanbul

2012 Bilimsel Çalışmalarda İstatistiğin Rolü: Bilinmesi Gereken Yöntemler ve Uygulama Alanları
26-27 Mart 2012, İstanbul

2010 Organ nakli ve HLA kursu
Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği VII. Kongresi
14 Ekim 2010, Eskişehir-Türkiye

2010 Deney Hayvanları Kullanım Kursu
İstanbul Üniversitesi, 07-18 Mart 2011, İstanbul- Türkiye

Uluslararası yayınlar

1. Temurhan S, **Akgul SU**, Caliskan Y, Artan AS, Kekik C, Yazici H, Demir E, Caliskan B, Turkmen A, Oguz FS, Sever MS. A Novel Biomarker for Post-Transplant Recurrent IgA Nephropathy. Transplant Proc. 2017 Apr;49(3):541-545.
2. Demir E, Yeğit O, Erol A, **Akgül SU**, Çalışkan B, Bayraktar A, Çalışkan Y, Türkmen A, Savran FO, Sever MS. Relevance of Flow Cytometric Auto-Crossmatch to the Post-transplant Course of Kidney Transplant Recipients. Transplant Proc. 2017 Apr;49(3):477-480.
3. Sahutoglu T, **Akgul SU**, Caliskan Y, Yazici H, Demir E, Kara E, Temurhan S, Savran FO, Turkmen A. Tac-MMF Versus CsA-MMF/CsA-AZA-Based Regimens in Development of De Novo Complement-Binding Anti-HLA Antibodies After Kidney Transplantation. Transplant Proc. 2017 Apr;49(3):454-459.
4. Karadeniz ST, **Akgul SU**, Ogret Y, Ciftci HS, Bayraktar A, Bakkaloglu H, Caliskan Y, Yelekci K, Turkmen A, Aydin AE, Oguz FS, Carin M, Aydin F. Corrected Panel-Reactive Antibody Positivity Rates for Hypersensitized Patients in Turkish Population With Calculated Panel-Reactive Antibody Software. Transplant Proc. 2017 Apr;49(3):445-447.
5. **Akgul SU**, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T, Kaya IA, Canitez IO, Demir E, Yazici H, Bakkaloglu H, Aydin AE, Turkmen A, Nane I, Aydin F, Oguz FS. Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. Transplant Proc. 2017 Apr;49(3):425-429.
6. Ozluk Y, Caliskan Y, Sevinc M, Bayram A, Arikan EA, Turkmen A, **Akgul S**, Savran FO, Sever MS, Kilicaslan I. Re-evaluation of glomerulitis using occlusion criteria based on the Banff 2013 revision: a retrospective study. Transpl Int. 2017 Jun;30(6):579-588.
7. Yalin GY, **Akgul S**, Tanrikulu S, Purisa S, Gul N, Uzun AK, Sarvan FO, Sever MS, Satman I. Evaluation of Glutathione Peroxidase and KCNJ11 Gene Polymorphisms in Patients with New Onset Diabetes Mellitus After Renal Transplantation. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2017 Jan 10. doi: 10.1055/s-0042-123040.
8. Temurhan S., Tamay Z.Ü., Gürkan H., **Akgül S.**, Özçeker D., Kekik Çınar Ç., et al., "The Effect of TGFB1 and CD14 Gene Polymorphisms on the Clinical

Findings of Cystic Fibrosis in Turkish Patients", INTERNATIONAL JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol.16, pp.40-47,2016.

9. **Akgul SU**, Oğuz FS, Çalışkan Y, Kekik C, Çağatay P, Türkmen A, Nane I, Aydın F, Temurhan S. The effect of anti-human leukocyte antigen, anti-major histocompatibility complex class 1 chain-related antigen a, and anti-glutathione transferase-T1 antibodies on the long-term survival of renal allograft. Transplant Proc. 2013 Apr;45(3):890-4.
10. **Akgul SU**, Oguz FS, Çalışkan Y, Kekik C, Gürkan H, Türkmen A, Nane I, Aydın F. The effect of glutathion S-transferase polymorphisms and anti-GSTT1 antibodies on allograft functions in recipients of renal transplant. Transplant Proc. 2012 Jul-Aug;44(6):1679-84.

Uluslararası kongrelerde poster sunumu

1. Kekik C, Temurhan S, **Akgul SU**, Çiftçi H, Öğret Y, Oguz FS. The Assesment of Balkan External Proficiency Testing (BEPT) For HLA Typing Since 2004. 11th East West Immunogenetics Conference, 10-11 March 2017, Olomouc, Czech Republic.
2. Ozkan MU, Emre S, **USTA S**, Yılmaz A, Yuruk Yıldırım Z, Oguz FS. Evaluation of The Relationship Between Progression of Chronic Kidney Diseas and Levels of Serum and Urine Uromddulin. Pediatr Nephrol. 2016;31:1765-1983.
3. C Kekik, İ.Yonal, FS. Oğuz, **S Usta**, S Temurhan, D. Batu,SK Beşışık, D Sargın.The Impact of Donor Spesific Anti-HLA and Anti-GSTT1 Antibodies on the Outcome of Allogeneic Stem Cell Transplantation. 28th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 25-28 June 2014, Stockholm, Sweden. Tissue Antigens 2014;84,5-164.
4. HU. Bozbey, SK. Besisik, **SU. Akgul**, FO.Savran, D.Sargın. IMPACT OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND CYTOCHROME P450 POLYMORPHISMS ON CLINICAL OUTCOME AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TANSPLANTATION. 40th EBMT2014-PHYSICIANS Congress, 30 March-2 April 2014, Milan, Italy.
5. Y Seyhun, HS Ciftci, C Kekik, **SU Akgul**, A Turkmen, FS Oğuz, F Aydın. Blood concentrations of Calcineurin inhibitors and Transforming Growth Facor-Beta, IL-6 gene polymorphisims in Turkish renal transplant patients. 27th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 11-14 May 2013, Maastricht-The Netherlands. Tissue Antigens 2013;81:322.
6. FS Oguz, SK Besisik, C Kekik, GE Karahan, S Temurhan, **S Usta**, F Aydın, D Sargın. Typing of relatives of patients being considered for allogeneic stem cell

transplantation. 26th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 31 May-3 June 2012, Liverpool-UK. Tissue Antigens 2012;79:441.

7. **Sebahat Usta**, Yasar Çalışkan, Hakan Gürkan, Çiğdem Kekik, Fatma O Savran, Aydın Türkmen. Influence of polymorphisms glutathione s-transferase and anti-gstt1 antibody on allograft outcome in renal transplant recipients. 15th Congress of the European Society for Organ Transplantation. 4-7 September 2011, Glasgow, United Kingdom.
8. FS Oguz, C Kekik, GE Karahan, **S.Usta**, G. Öztürk, M.Carin. EFI Region 8 Balkan External Proficiency Testing (BEPT) for HLA typing: results of 7 years. 25th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 04-07 May 2011, Prague-Czech Republic. Tissue Antigens 2011;77:468.
9. Y. Seyhun, G. Karahan, C. Kekik, H. Tozkır, **S. Usta**, F. Oguz, M. Carin. Quality control program for HLA antigen/allele typing and antibody screening tests. 1st International Proficiency Testing Conference, 11-13 October 2007, Sinaia-Romania.
10. GE Karahan, H. Tozkır, Y.Seyhun, **S.Usta**, F.Oguz, M.Carin. An overview of Istanbul Medical Faculty Cadaveric Kidney Waiting List (2006). 21st EFI Conference, 5-8 May 2007, Barcelona-Spain. Tissue Antigens 2007;69:494.

Sözlü sunulan bildiriler

1. Çalışkan Y, **Akgül SU**, Temurhan S, Artan AS, Özlük Y, Yazıcı H, Oğuz FS, Türkmen A, Sever MŞ. IgA Nefropatisi için Yeni Serolojik ve Genetik Biyobelirteç: Galaktozillenmesi Yetersiz IgA1 Düzeyi ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 2016;25;1. 19-23 Ekim 2016, Antalya.
2. Karadeniz S, **Akgül SU**, Kaya Aİ, Asal Z, Çiftçi HS, Bayraktar A, Bakkaloğlu H,Ç Çalışkan YK, Türkmen A, Oğuz FS, Çarin M, Aydın F. Türk Populasyonunda Hipersensitize hastaların Hesaplamalı Sanal PRA-CPRA ile Düzeltilmiş PRA Oranları. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 11. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.
3. Şahutoğlu T. **Akgül SU**, Çalışkan Y, Yazıcı H, Demir E, Kara E, Temurhan S, Oguz Savran F, Türkmen A. TACROLİMUS VERSUS CYCLOSPORİNE A BASED REGİMENS İN DEVELOPMENT OF DE NOVO COMPLEMENT BİNDİNG ANTİ HLA ANTİBODİES AFTER KİDNEY TRANSPLANTATİON. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 11. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.
4. Bayraktar A, Bakkaloğlu H, **Akgül SU**, Oğuz FS, Aydın A.E. HAZİRAN 2016 TARİHİNDEN İTİBAREN UYGULANMAYA BAŞLANAN YENİ

BÖBREK DAĞITIM SİSTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 11. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.

5. Demir E, Yegit O.O, Erol A., **Akgül SU**, Çalışkan B, Çalışkan Y, Türkmen A, Savran Oğuz F, Sever M.Ş. THE RELEVANCE OF FLOW CYTOMETRIC AUTO-CROSSMATCH TO THE POSTTRANSPLANT COURSE OF KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 11. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.
6. Temurhan S, Tamay Z, Gürkan H, **Akgul SU**, Özçeker D, Çınar Ç, Çağatay P, Aydın F, Güler N. Türk Popülasyonundaki Kistik Fibrozis Hastalarında TGFB1 ve CD14 Gen Polimorfizmleri İle Hastalık Prognozu Arasındaki İlişkinin Araştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim 2015, Muğla.
7. **SU Akgül**, S Temurhan, H Bakkaloğlu, Ç Kekik, Y Çalışkan, A Türkmen, AE Aydın, İ. Nane, FS Oğuz. Anti Timosit Globulin (ATG) İndüksiyonun Beklenmedik Etkisi: De novo HLA-A3 Antikorları ve Klinik Önemi. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 10. Kongresi, 15-18 Ekim 2014, Bodrum.
8. İ Yönel, Ç Kekik, FS Oğuz, **S Usta**, S Temurhan, DB Demir, SK Beşışık, FD Sargın. Allogegnik kök hücre nakli sonrası anti-HLA ve anti-GSTT1 antikorlarının nakil başarısı üzerine etkisi. 8. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök hücre tedavileri kongresi, 6-8 Mart 2014, Antalya.
9. H.Gürkan, **SU. Akgül**, A. Bayrak, Ş.Palandüz, A.Kadıoğlu, F. Aydın. İnfertil Erkek hastalarda Y kromozomu azospermi ilişkili Faktör delesyonlarının fenotipe etkisinin araştırılması. XII. National Medical Biology and Genetic Congress, 27-30 October 2011, Antalya-Turkey
10. **S Usta**, Y Çalışkan, Ç Kekik, A Türkmen, FS Oğuz. Akut rejeksiyon gelişiminde GSTT1'e karşı gelişen donör spesifik antikorların önemi. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 8. Kongresi, 12-16 Ekim 2011, Antalya.
11. Ç Kekik, G Karahan, FS Oğuz, S Temurhan, **S Usta**, H Bakkaloğlu, Y Çalışkan, A Türkmen, AE Aydın, U Eldegez, MN Çarin. Kadavra kaynaklı böbrek donörü bekleme listesindeki hastaların Anti-HLA antikor profilleri. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 7. Kongresi, 14-17 Ekim 2010, Eskişehir.
12. **SU Akgül**, YK Çalışkan, H Gürkan, Ç Kekik, A Türkmen, M Çarin, FS Oğuz. Böbrek nakli alıcılarında Glutatyon S-Transferaz polimorfizmlerin ve anti-

GSTT1 antikorların allograft fonksiyonları üzerindeki etkileri. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 7. Kongresi, 14-17 Ekim 2010, Eskişehir.

13. Y. Seyhun, G. Karahan. Ç. Kekik, H. Tozkır, **S. Usta**, F. Oğuz, M. Çarin. HLA alel, antijen ve antikor kalite kontrol programı. Medical Laboratory Symposium of Clinical Biochemistry Specialists Society, 2nd Symposium of Quality and Accreditation, 1-4 Novembr 2006, Girne-Turkey.

Ulusal kongrelerde poster olarak sunulan bildiriler

1. **Akgül SU**, Çiftçi HS, Temurhan S, Çınar ÇK, Çalışkan Y, Bayraktar A, Demir E, Bakkaloglu H, Yazıcı H, Aydın AE, Türkmen A, Aydın F, Oğuz FS. Gebeliğin Anti-HLA Profili Üzerine Etkisi. 6.Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi.6-9 Nisan 2017, Antalya.
2. Bayraktar A, **Akgül SU**, Temurhan S, Çınar ÇK, Çalışkan Y, Demir E, Çiftçi HS, Bakkaloglu H, Çalışkan Y, Yazıcı H, Aydın AE, Türkmen A, Aydın F, Oğuz FS. Kadavra Donörden Böbrek Bekleyen Anti-HCV Pozitif Hastalarda HLA Antijenleri ve HLA Antikorlarının Değerlendirilmesi. 6.Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi.6-9 Nisan 2017, Antalya.
3. Karadeniz MS, İşbara AE, **Usta S**, Şentürk HC, Tefik T, Şanlı Ö, Pembeci k, Tuğrul MK. Parsiyel Nefrektomi Operasyonlarından Sonra Gelişen Perioperatif Akut Böbrek Yetersizliğinin Erken Tanısında Serum Neutrophil Geletinase-Associated Lipocalin'İN (NGAL) Önemi. Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği 50. Ulusal Kongresi, 26-30 Ekim 2016, İstanbul.
4. **Akgül S.U**, Çiftçi H.Ş, Temurhan S, Çalışkan Y, Bayraktar A, Tefik T, Kaya İ.A., Canitez İ.O, Demir E, Yazıcı H, Bakkaloğlu H, Aydın A.E, Nane İ, Türkmen A, Aydın F, Savran Oğuz F. SON DÖNEM BÖBREK YETMEZLİĞİ OLAN HASTALARDA HLA ALLOİMMÜNİZASYON NEDENLERİNİN ANTİ HLA ANTİKOR PROFİLİ ÜZERİNE ETKİLERİ. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 9. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.
5. Temurhan S, **Akgül SU**, Çalışkan Y, Artan A.S, Yazıcı H, Çalışkan B, Türkmen A, Savran Oğuz F, Sever M.Ş. POST-TRANSPLANT IGA NEFROPATİ NÜKSÜ TANII VE HASTALIK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRMESİNDE YENİ BİR BİYO-BELİRTEÇ: GALAKTOZİLLENMESİ YETERSİZ IGA1 DÜZEYİ. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 9. Kongresi, 13-15 Ekim 2016, Konya.
6. Ç Kekik, S Temurhan, **SU Akgül**, FS Oğuz. Spondiloartropatili Türk hastalarda HLA-A ,-B allel sıklığı. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2013, Kuşadası, Aydın.
7. Ç Kekik, **S Usta**, S Temurhan, FS Oğuz. EFI REGION 8 'BALKAN EXTERNAL PROFICIENCY TESTING (BEPT)' 2012 HLA TİPLEMESİ.

Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi, 18-21 Nisan 2013, İzmir

8. **SA Usta**, S Temurhan, C Kekik, YK Çalışkan, P Çağatay, A Türkmen, İ Nane, F Aydın, FS Oğuz. Uzun dönem renal allogreft sağkalımı üzerine HLA, MICA ve GSTT1 antikorlarının etkisi. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 9. Kongresi, 26-29 Eylül 2012, Bursa.
9. S Temurhan, **SA Usta**, YK Çalışkan, Ç Kekik, H Bakkaloğlu, FS Oğuz, A Türkmen, AE Aydın, U Eldegez, MN Çarin. Kadaverik vericiden nakil olan son dönem böbrek yetmezlikli (SDBY) hastaların immünolojik parametreleri. Türkiye Organ Nakli Koordinasyon Kuruluşları Derneği 9. Kongresi, 26-29 Eylül 2012, Bursa.
10. H.Gürkan, **SU.Akgül**, A. Bayrak, Ş.Palandüz, A.Kadioğlu, F. Aydın. Azospermik klinefelter Sendromlu Türk Hastalarda Y Kromozomu Azospermi İlişkili Faktör Kayıplarının Araştırılması. XII.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, Antalya.
11. **Sebahat Usta**, Hakan Gürkan, Yasar Çalışkan Çiğdem Kekik, Aydın Türkmen, Fatma O Savran. Association of acute or chronic rejection development with GST polymorphisms in patients transplanted from living-related kidney donors. 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International Participation. 1-5 December 2010, Istanbul-Turkey.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Toprak ile uğraşmak
Kitap okumak