



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAYGIN GÖRÜLEN MEFV GENİNE AİT
MUTASYONLARIN GEN EKSPRESYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

EDA GANİYUSUFOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAYGIN GÖRÜLEN MEFV GENİNE AİT
MUTASYONLARIN GEN EKSPRESYONLARININ
ARAŞTIRILMASI

EDA GANİYUSUFOĞLU

Bu tez,
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Eda GANIYUSUFOĞLU tarafından hazırlanan “Yaygın Görülen MEFV Genine Ait Mutasyonların Gen Ekspresyonlarının Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 09/08/2018 tarihinde oy birliği ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin KILINÇ (Danışman)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN (ÜYE)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Gözde YILDIRIM ÇETİN (ÜYE)

İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK (ÜYE)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Gaziantep Üniversitesi

Dr. Öğr. Üy. Necla BENLİER (ÜYE)

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

SANKO Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Eda GANIYUSUFOĞLU

Bu çalışma KSÜ BAP tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2016/6-47D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

YAYGIN GÖRÜLEN MEFV GENİNE AİT MUTASYONLARIN GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada ilk olarak klinik açıdan Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastası olduğu düşünülen hastalarda bulunan mutasyonların DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmesi ve mutasyon tespit edilen hastaların gen ekspresyon düzeylerinin Real-Time PCR yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MEFV geninde mutasyon bulunan 47 hasta ile mutasyon bulunmayan 8 kişi kontrol grubu olarak incelenmiş olup, genotip-fenotip ile gen ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda sık görülen mutasyonlar, heterozigot genotipte, R202Q, E148Q ve M680I; birleşik heterozigot genotipte, R202Q/M694V, R202Q/E148Q; kompleks heterozigot genotipte, R202Q/M694V/M680I ve R202Q/M694V/V726A; homozigot genotipte, M680I/M680I; birleşik homozigot genotipte, R202Q/R202Q+M694V/M694V olarak bulunmuştur.

MEFV geninde mutasyon bulunan hastaların gen ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Homozigot mutasyon bulunan hastaların gen ifade düzeyi, sağlıklı kontrol grubu ve heterozigot mutasyon bulunan hastalardan önemli oranda düşük bulunmuştur. R202Q mutasyon birlikteliğinde görülen mutasyonların gen ekspresyon düzeyindeki azalma dikkat çekmektedir.

Mutasyon görülen hastalarda karın ağrısı ve ateş en sık görülen belirti olarak karşımıza çıkmaktadır Klinik belirtilerin şiddetli görüldüğü R202Q/M694V homozigot mutasyonunda gen ekspresyon düzeyinde önemli oranda bir azalma tespit edilmiştir. Klinik belirtilerin hafif görüldüğü E148Q mutasyonunda genin ekspresyon düzeyi ise diğer mutasyonlara oranla daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak genotip ile gen ekspresyon düzeyi arasında bir ilişki mevcut olup, gen ekspresyon düzeyi ile klinik belirtiler arasında ters bir korelasyon bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), MEFV geni, gen ekspresyonu

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Ağustos/2018

Danışman: Prof. Dr. Metin KILINÇ

Sayfa sayısı: 83

INVESTIGATION OF GENE EXPRESSIONS OF COMMON MEFV GENE MUTATIONS

ABSTRACT

In this study, the first aim was to detect the mutations in the patients who were diagnosed with Familial Mediterranean Fever (FMF), according to Tel-Hashomer diagnostic criteria by gene sequencing and to determine the gene expression levels in the patients with a mutation by Real-Time PCR methods. For this purpose, we studied 47 patients with MEFV gene mutation and 8 control individuals without mutation and investigated the relationship between genotype-phenotype and the gene expression levels.

At the end of the study, the most common mutations; in heterozygote genotype were R202Q, E148Q and M680I; in compound heterozygote genotypes were M694V/R202Q and R202Q/E148Q; in complex heterozygote genotypes were R202Q/M694V/M680I and R202Q/M694V/V726A; in homozygote genotype M680I/M680I; and in compound homozygote genotype were M694V/M694V+R202Q/R202Q.

The expression levels of the gene in patients with mutations in the MEFV gene was lower than healthy control groups. The gene expression levels of the patients homozygous mutations were found to be significantly lower than the control group and the patients with heterozygous mutations. It was also revealed that the decline in the gene expression seen in the patients with any mutation co-existed with R202Q was found to be significant.

Peritonitis and fever were the most common symptoms in the patients with mutation. In the patients R202Q/M694V homozygous mutations, where clinical manifestations are severe, a remarkable decrease in gene expression was observed. In those with E148Q mutations, on the other hand, clinical symptoms were mild and the gene expression levels were higher.

As a result, it was found that there was a relationship between the genotype and gene expression level and the level of gene expression and clinical symptoms were inversely correlated.

Key Words: Familial Mediterranean Fever (FMF), MEFV gene, gene expression

Kahramanmaraş Sütçü İmam University

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Bioengineering and Science, August/2018

Supervisor: Prof. Dr. Metin KILINÇ

Page number: 83

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren ve her konuda yardımcı olan danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmama katkılarından dolayı değerli hocalarım, Prof. Dr. İsmail AKYOL'a, Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a, Doç. Dr. Gözde YILDIRIM ÇETİN'e, Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK'e, Dr. Öğr. Üy. Necla BENLİER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarından dolayı değerli arkadaşım Arş. Gör. Hasan DAĞLI'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı Biyokimya laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Yeliz DOBOOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez jürimin belirlenmesindeki yardımlarından dolayı değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ayşe HEDEF'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmamda bana öncülük eden ve her konuda yardımcı olan değerli ablam Dr. Öğr. Üy. Yekta GEZGİNÇ'e, teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emekleri çok olan anneme, babama teşekkür ederim.

Eda GANİYUSUFOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
DİZİ DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), Familial Mediterranean Fever (FMF)	2
1.2. Tarihçe	2
1.3. Epidemiyoloji	3
1.4. Patogenez	5
1.5. Genetik	8
1.5.1. MEFV geni	8
1.5.2. MEFV geni mutasyonları	11
1.5.3. Pyrin/Marenostrin protein	13
1.6. Klinik Belirtiler	14
1.6.1. Ateş	16
1.6.2. Karın ağrısı	17
1.6.3. Göğüs ağrısı	17
1.6.4. Eklem ağrısı	18
1.6.5. Cilt belirtileri	18
1.6.6. Nadir görülen semptomlar	19
1.6.7. Ataklar arası dönem	20
1.6.8. Amiloidoz	21
1.7. Tanı Kriterleri	22
1.7.1. Laboratuvar bulguları	24
1.7.2. Moleküler genetik tanı	24
1.8. Tedavi	25
1.9. Genotip-Fenotip İlişkisi	27
1.10. Moleküler Tanımlama Yöntemleri	28
1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
1.10.1.1. Real Time PCR (RT-PCR)	29
1.10.1.1.1. Real Time PCR'da kullanılan belirleme teknolojileri	30
1.10.2. DNA dizi analizi	33

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	34
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Materyal	37
3.2. Metod	37
3.2.1. DNA izolasyonu	37
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	37
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	39
3.2.4. Exosap	39
3.2.5. Döngü sekans reaksiyonu	40
3.2.6. PCR ürünlerinin pürifikasyonu	41
3.2.7. DNA dizi analizi	41
3.2.8. Total RNA eldesi	41
3.2.9. Tek sarmal cDNA eldesi	42
3.2.10. MEFV geninin gen ifade düzeyinin Real Time PCR (Eş Zamanlı PCR) yöntemi ile belirlenmesi	42
4. BULGULAR	44
4.1. MEFV Geninin PCR Amplifikasyonu Sonuçları	44
4.2. Amplifikasyonların DNA Dizi Analizi Sonuçları	45
4.3. MEFV Geninin İfade Analizi Sonuçları	47
4.3.1. MEFV geninin referans gen GAPDH ile karşılaştırılması	58
4.3.2. MEFV geninde mutasyon olan hastaların gen ifadesinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması	59
4.3.3. MEFV geninde görülen mutasyon çeşitlerinin ifade düzeylerinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması	61
4.3.4. MEFV geninde bulunan heterozigot ve homozigot mutasyonların gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması	63
4.3.5. MEFV geninde mutasyon olan hastaların klinik belirtileri ile gen ifadesi arasındaki ilişki	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. AAA'da yaygın görülen M694V ve V726A mutasyonlarının ülkelere göre dağılımı	5
Şekil 1.2. AAA'nın patogenezi.....	7
Şekil 1.3. AAA geninin (MEFV) 16. kromozomdaki konumu	9
Şekil 1.4. MEFV geninde görülen mutasyonların ekzonlara göre dağılımı.....	12
Şekil 1.5. Pysin proteinin yapısı ve mutasyon bölgeleri.	13
Şekil 1.6. AAA'ya ait klinik belirti ve bulgular..	16
Şekil 1.7. Çayır safranı (colchicum autumnale) bitkisi.....	25
Şekil 1.8. Kolşisinin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 4.1. PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz ekzon 2 ve ekzon 3 bölgesi için jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.2. PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz ekzon 3 bölgesi için jel görüntüsü. 1	44
Şekil 4.3. Ekzon 2 bölgesinde görülen R202Q heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü.....	47
Şekil 4.4. Ekzon 10 bölgesinde görülen M694V heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü.....	47
Şekil 4.5. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.6. MEFV geninde mutasyon olan hastaların gen ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması	60
Şekil 4.7. MEFV geninde görülen mutasyonlara göre genin ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması	62
Şekil 4.8. Ekzonlar arası istatistik analiz sonuçları	63
Şekil 4.9. MEFV geninde görülen heterozigot ve homozigot mutasyonların gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Tel Hashomer tanı kriterleri.....	23
Çizelge 1.2. Livneh tanı kriterleri.....	23
Çizelge 3.1. PCR işlemi aşamaları.....	38
Çizelge 3.2. Exosap PCR işlemi aşamaları.....	40
Çizelge 3.3. Döngü sekans PCR işlemi aşamaları.....	40
Çizelge 3.4. Real Time-PCR işlemi aşamaları.....	43
Çizelge 4.1. Olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı.....	45
Çizelge 4.2. MEFV genine ait cDNA konsantrasyonları ile C _t değerleri.....	48
Çizelge 4.3. Mutasyonlara göre MEFV geni ve kıyaslama yaptığımız referans gen GAPDH'e ait olan $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ile MEFV genine ait katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	50
Çizelge 4.4. Referans gen GAPDH ve MEFV genine ait istatistik analiz sonuçları.....	59
Çizelge 4.5. MEFV geninde mutasyon bulunan hastalar ile mutasyonu bulunmayan bireylere ait istatistik analiz sonucu.....	61
Çizelge 4.6. Ekzonlar arası istatistik analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.7. Hastalara ait fenotipik özellikler.....	65

DİZİ DİZİNİ

Sayfa No

Dizi 2. 1. MEFV genine ait cDNA dizisi	9
--	---

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAA (FMF)	: Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever)
MEFV	: Ailevi Akdeniz Ateşi geni (Mediterranean Fever)
SAA	: Serum Amiloid A
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
kb	: Kilobaz
M	: Metiyononin
A	: Alanin
V	: Valin
I	: İzolösin
E	: Glutamik asit
Q	: Glutamin
D	: Aspartik asit
T	: Treonin
P	: Prolin
S	: Serin
N	: Asparjin
F	: Fenilalanin
K	: Lizin
R	: Arginin
H	: Histidin
Del	: Delesyon
Pyrin	: Pirin proteini
kDa	: Kilo Dalton
ASC	: Adaptör protein (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD)
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
PyD	: Pirin Domaini
CRP	: C- Reaktif Protein
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
IL-1	: İnterlökin-1
NF-kappaB	: Nükleer Faktör kappaB
IL-6	: İnterlökin-6

IL-8	: İnterlökin-8
C5a	: Kompleman5a
HLA B27	: İnsan Lökosit Antijeni B27
ESR	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
WBC	: Beyaz Kan Hücreleri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RT-PCR	: Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NSAID	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
cm²	: Santimetre kare
HSP	: Henoch Schönlein Purpurası
PAN	: Poliarteritis Nadosa
ECG	: Ekokardiyogram
BD	: Behçet hastalığı
C3	: Akut faz reaktanı
C4	: Akut faz reaktanı
C5a	: Akut faz reaktanı
p	: Kromozomun kısa kolu
°C	: Santigrat derece
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
dL	: Desilitre
gr	: Gram
mg	: Miligram
ng	:Nanogram
Taq	: Thermus aquaticus bakterisi
g	: Devir sayısı
pH	: Asitlik-bazlık derecesi
M	: Molar
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
TBE	: Tris-Borik asit EDTA
AA	: Amiloid A
ddH₂O	: Deiyonize su

HDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
A.B.D	: Amerika Birleşik Devletleri
∞	: Sonsuz
A	: Alfa
γ	: Gama
μM	: Mikro Molar
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
C_t	: Döngü eşik değeri
dsDNA	: Çift iplikli DNA
SNP	: Tek nükleotid polimorfizm
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
FAM	: 6-karboksifloresin
TET	: Tetrakloro-6-karboksi flöresin
HEX	: Hekzakloro-6-karboksi floresin
TAMRA	: 6-karboksitetra metil rodamin
DABCYL	: 4-(dimetilaminoazo)benzen-4-karboksilik asit
ddNTP	: Dideoksi nükleotid trifosfat
dATP	: Deoksi adenzin trifosfat
dGTP	: Deoksi guanozin trifosfat
dCTP	: Deoksi sitozin trifosfat
dTTP	: Deoksi timidin trifosfat
ddATP	: Dideoksi adenzin trifosfat
ddGTP	: Dideoksi guanozin trifosfat
ddCTP	: Dideoksi sitozin trifosfat
ddTTP	: Dideoksi timidin trifosfat
T_M	: Erime sıcaklığı
N	: Döngü sayısı

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (Familial Mediterranean Fever, FMF), otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Hastalık, yaygın olarak Akdeniz kökenli Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap toplumlarında görülmektedir. AAA, tekrarlayan ve kendi kendini sınırlayan ataklarda ateş ile birlikte peritonit, plörit, sinovit ve erizipel benzeri eritem görülmesi ile karakterizedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Yalçınkaya ve ark., 2000). Hastalığın en ciddi komplikasyonu amiloidoz olup, böbrek yetmezliğine neden olmaktadır (Shohat ve ark., 1999). Hastalığın tedavisinde düzenli kolşisin kullanımı ile hem atakların sıklığı ve şiddeti azalmaktadır, hem de böbrek yetmezliğine neden olan amiloidoz gelişimi önlenmiş olmaktadır (Cazeneuve ve ark., 1999).

Ailevi Akdeniz Ateşine sebep olan MEFV geni (MEDiterranean FeVer), 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3. bölgesinde bulunmaktadır. MEFV geni 10 ekzon bölgesi içermekte ve 781 amino asit içeren sitoplazmik bir protein olan Pysin/Marenostriini kodlamaktadır (Yılmaz ve ark., 2001; Türk FMF Çalışma grubu, 2005; Öztürk ve ark., 2012). MEFV geni, olgun nötrofillerde eksprese olup, inflamasyonun düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Centola ve ark., 2000). Pysin proteini miyeloid/monositik hücrelerde eksprese olup, interlökin 1 beta (IL-1 β) işlemlerinin düzenlenmesinde, transkripsiyonel düzenleyici faktör NF-kappaB aktivasyonunda görev yapmakta ve apoptozisi sağlamaktadır (Abraham, 2003; Önen, 2006). Türkiye’de FMF hastalığı görülme sıklığı diğer ülkelerle kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Hastalığın görülme sıklığı 1:400 ile 1:1000 arasında değişmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına ait bugüne kadar 300’den fazla mutasyon tanımlanmış olup bu mutasyonların çoğu ekzon 10, ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 5’te bulunmakta iken az sayıda mutasyon ekzon 1, ekzon 4, ekzon 7, ekzon 8 ve ekzon 9’da bulunmaktadır (Infervers, 2018).

Çalışmamızda ilk olarak tanı kriterlerine göre AAA hastası olduğu düşünülen hastalardaki mutasyonların DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmesi ve belirlenen mutasyon türüne göre gen ekspresyon düzeylerinin Real Time PCR yöntemiyle incelenmesi amaçlanmaktadır.

1.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), Familial Mediterranean Fever (FMF)

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), Familial Mediterranean Fever (FMF), başlıca Akdeniz kökenli olan, Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap toplumlarında yaygın olarak görülmeyle birlikte nadir olarak Fransa, Almanya, İtalya, İspanya'nın yanı sıra Amerika ve Avustralya gibi ülkelerde de görülebilen otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Çakar ve ark., 2001; Ben-Chetrit ve Touitou, 2009; Özalkaya ve ark., 2011). AAA, klinik belirti olarak tekrar eden ataklarda peritonit, plörit, artrit/artralji, miyalji ve erizipel benzeri eriteme ateşin eşlik etmesi ile karakterizedir. Tipik bir AAA atağı yaklaşık olarak 3 gün sürmektedir. Serum amiloid A (SAA) tipindeki amiloidoz hastalığının en önemli komplikasyonu olup, başlıca kronik böbrek yetmezliğine neden olmak üzere diğer organlarda etkilenmektedir (Önen, 2006; Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). Kolşisin tedavisi, AAA'ya ait atakların sıklığını ve şiddetini azaltmanın yanı sıra amiloidozuda önlemektedir (Bakkaloğlu, 2003). AAA'ya ait klinik belirtilerin %80'den fazlasının 20 yaşından önce ortaya çıkması nedeniyle FMF çocukluk çağı hastalığıdır. Hastaların yaklaşık olarak %5'inde hastalık belirtileri 30 yaşından sonra ortaya çıkmıştır (Samuels ve ark., 1998; Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sebep olan gen, 16. kromozomun kısa kolunda 16p.13.3 bölgesinde bulunup, "MEFV" (for MEditerranean FeVer) olarak kısaltılmıştır. Bu gen, 10 ekzon içermekte ve 781 amino asit içeren Pyyrin ya da Marenostirin olarak adlandırılan proteini kodlamaktadır (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005; Farivar ve ark., 2010).

Hastalığın görülme sıklığı diğer ülkelerle kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Türkiye 'de AAA prevalansı yaklaşık olarak 70 milyon olan toplumda 1:400 ile 1:1000 arasında değişmektedir. Türkiye'de 100.000'den fazla AAA hastası olduğu tahmin edilmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). MEFV geninin mesaj düzeyi genotip-fenotip arasındaki ilişkiyle bağlantılı bulunmuştur (Notarnicola ve ark., 2002).

1.2. Tarihçe

Ailevi Akdeniz Ateşi, literatürde ilk olarak 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından, 16 yaşındaki Yahudi bir kız çocuğunda görülen tekrar eden ataklarda ateş, karın ağrısı ve lökositoz ile tanımlanmıştır (Samuels ve ark., 1998). Hastalık 1945 yılında, Siegal tarafından tam olarak tanımlanarak "benign paroksizmal peritonitis" olarak adlandırılmıştır. Bu tanımlamadan sonra hastalığa, periyodik peritonitis, ailevi tekrarlayan

poliserotis, periyodik hastalık gibi isimler verilmiştir (Samuels ve ark., 1998; Adwan, 2015). 1948 yılında Reimann hastalığı “Periyodik hastalık” olarak isimlendirmiştir (Adwan, 2015). 1951 yılında Fransız iki doktor Cattani ve Mamou FMF ile böbrek hastalıklarının bağlantılı olduğuna dikkat çekerek hastalığın ailevi olduğunu belirtmişlerdir (Örüm ve Yalçınkaya, 2003; Adwan, 2015;). 1958 yılında ilk kez Heller ve arkadaşları “Ailevi Akdeniz Ateşi” tanımını yapmışlar, aynı yazarlar 1961 yılında hastalığın otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık olduğunu belirtmişlerdir (Örüm ve Yalçınkaya, 2003; Adwan, 2015). Hastalığın “ailevi Akdeniz ateşi” olarak tanımlanması otozomal resesif geçişli genetik olması, Akdeniz kökenli toplumlarda görülmesi ve tekrarlayan ateş belirtisiyle ortaya çıkması nedeniyle yapılmıştır (Samuels ve ark., 1998).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı Türkiye’de ilk olarak 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından 1946 yılında “Garip Bir Karın Ağrısı” tanımı ile bir hastada tanımlanmıştır (Örüm ve Yalçınkaya, 2003).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sebep olan MEFV geni 1997 yılında tanımlanarak, Amerikan ve Fransız iki ayrı grup tarafından 16. kromozomda haritalanmıştır. MEFV geninin ürünü 781 amino asit içeren bir protein olan Amerikalı grup tarafından Pyrin olarak; Fransız grup tarafından Marenostrin olarak adlandırılmıştır. 1972 yılında kolşisinin bulunup kullanılması ile hastalığa ait atakların sıklığı ve şiddetinde azalma gözlenerek, amiloidoz gelişimi de önlenmiştir (Adwan, 2015).

1. 3. Epidemiyoloji

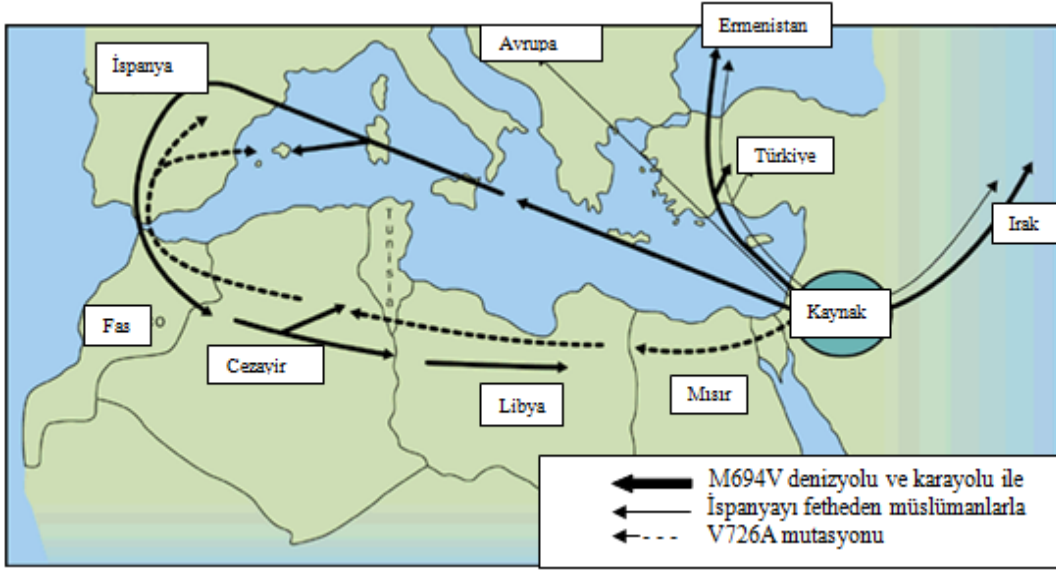
Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı, başlıca Akdeniz ve çevresindeki toplumların etkilendiği, klinik olarak tekrar eden ataklarda ateş ile birlikte peritonit, plörit, artirit gibi belirtiler ile ortaya çıkan kalıtsal otoinflamatuvar bir hastalıktır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Beheshtian ve ark., 2016). AAA, Doğu Akdeniz kökenli olan özellikle Askenazi olmayan Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap toplumlarında yaygın olarak görülmektedir. Hastalık daha az sıklıkta Fransa, İspanya, Almanya, Polonya, Avustralya, Brezilya, Yunanistan, İtalya, Küba, Belçika gibi ülke populasyonlarında da görülmektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Önen, 2006; Ben-Chetrit ve Toubou, 2009). Diğer ülkelerle kıyaslandığında Türkiye’deki AAA hastası sayısı yüksek bulunmuş olup, hastalığın görülme sıklığı 1:400 ile 1:10,000 arasında değişmektedir. Orta Anadolu hasta sayısının en fazla görüldüğü bölge olup prevalansı 1:395 bulunmuştur (Önen, 2006; Sarı ve ark., 2014). Hastalığın ikinci olarak yaygın görüldüğü etnik grup Ermeniler olup, yapılan çalışmalarda hastalığın görülme

sıklığının 1:500 olduğu belirtilmiştir. Sefardik Yahudilerde yapılan çalışmalarda hastalığın görülme sıklığının 1:250 ile 1:1000 arasında değiştiği bulunmuştur. İsrail’de yapılan çalışmalarda hastalığın görülme sıklığı ortalama 1:1000 olarak tespit edilmiştir. Orta Doğu ve Batı Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda 19 yaş altı AAA hastası görülme sıklığı 2:1milyon olduğu rapor edilmiştir (Sarı ve ark., 2014). Orta Doğu’daki Suriye, Lübnan, Ürdün gibi ülkelerde AAA hastası prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Kuzey Afrika, Yunanistan, Fransa, Almanya, İtalya ve Amerika gibi ülkelerde önemli sayıda AAA hastası olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Japonya’da 100 kadar AAA hastası olduğu rapor edilmiştir. Etiyopya, Yemen, İskandinav ülkelerinin yanı sıra Güney Asya ve Hindistan, Tayland gibi Uzak Doğu ülkelerinde ise hangi ülkede ne kadar AAA hastası olduğu tespit edilememiştir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009).

AAA hastalığını taşıyıcı sıklığı diğer toplumlarla kıyaslandığında Türklere yüksek bulunarak 1:5 olduğu tespit edilmiştir. Kuzey Afrika Yahudileri ve Ermenilerde taşıyıcı sıklığının 1:7 olduğu bulunmuştur. Taşıyıcı sıklığı Askenazi olmayan Yahudiler arasında düşük bulunarak 1:11 olduğu bildirilmiştir (Önen, 2006).

Yapılan bazı çalışmalarda erkeklerde hastalığın daha fazla görüldüğü bildirilmesine rağmen her iki cinsiyette hastalığın görülme sıklığı aynı oranda bulunmuştur (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sebep olan MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. MEFV geni 781 amino asit içeren Pyrin/Marenostin adı verilen proteini kodlamaktadır (Yılmaz ve ark., 2001; Türk FMF Çalışma Grubu, 2005; Özalkaya ve ark., 2011). 10 ekzon içeren MEFV geninde ilk olarak yaygın görülen 4 yanlış anlamlı mutasyon M694V, M694I, V726A ve M680I ekzon 10 bölgesinde tanımlanmıştır (Yılmaz ve ark., 2001; Özen ve ark., 2017). Daha az sıklıkta mutasyon ise ekzon 2, 3, 5 ve 9 bölgelerinde bulunmaktadır (Yılmaz ve ark., 2001). Ekzon 2 bölgesinde E148Q mutasyonu yaygın olarak görülmektedir. İsrail’de, Kuzey Afrika Yahudi’lerinde M694V ve E148Q mutasyonu, Irak Yahudi’lerinde V726A, M694V, E148Q ve M680I mutasyonları, Askenazi Yahudilerinde E148Q ve V726A mutasyonları; Orta Doğu’da bulunan Arap’larda V726A, M680I, M694V, M694I ve E148Q mutasyonları; Türkiye’ler ve Ermeni’lerde M694V, M680I, V726A ve E148Q mutasyonları; Japon’larda M694I, R761H, L110P ve E148Q mutasyonları yaygın olarak görülmektedir (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). Yaygın görülen M694V ve V726A mutasyonlarının ülkelere göre dağılımı Şekil 1.1.’de gösterilmiştir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).



Şekil 1.1. AAA'da yaygın görülen M694V ve V726A mutasyonlarının ülkelere göre dağılımı (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

1.4. Patogenez

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında mutasyonlara sebep olan MEFV geni, pyrin ya da marenostrin olarak adlandırılan proteini kodlamaktadır (Öktem ve ark., 2004). Pyrin proteinin sentezinde meydana gelen bozukluktan dolayı mutasyonlar meydana gelmektedir (Balkarlı ve ark., 2016). Başlıca olgun granulosit ve fibroblastlarda eksprese olan pyrin protein, inflamasyonun düzenlenmesi ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır (Öktem ve ark., 2004; Balkarlı ve ark., 2016).

Pyrin proteinin granulositlerde fazla miktarda eksprese olması inflamasyon araçlarının down regülasyonunu sağladığı görüşünü desteklemektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Kemik iliği hücrelerinde MEFV mRNA'sı tespit edilmemiştir. Nötrofiller akut inflamasyonun önemli hücreleri olduğu için pyrin proteinin bu hücrelerdeki rolü önemlidir (The International FMF Consortium, 1997). Bir başka önemli nokta sinoviyal ve peritoneal hücrelerde pyrin/marenostrin ekspresyonunun eksik olmasından dolayı doku spesifik tarzda etkili olmadığı ortaya konulmuştur. Mutasyon nedeniyle nötrofillerde pyrin/marenostrinde meydana gelen bozukluk, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna yol açarak bu hücrelerin serozal dokulara göçüne sebep olmaktadır. AAA'da meydana gelen inflamasyonların başlıca hedefinin niçin serozal dokular olduğu açıklık kazanmamıştır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Hastalığa ait atakların ortaya çıkışını fiziksel ve duygusal

stres, menstruasyon, yüksek yağlı diyet gibi faktörler tetiklemektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

Pyrin protein, apoptozis ile ilgili bir protein olan ASC (apoptosis-associated speck like protein) ile etkileşim sonucunda kaspaz-1 aktivasyonu ve interlökin-1 β yapımında artış meydana gelmesiyle inflamasyonu düzenlemektedir (Samuels ve Ozen, 2006; Önen, 2006; Sönmez ve ark., 2016). MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda interlökin-1 β (IL-1 β) düzeylerinde meydana gelen artış inflamasyonun fazla olmasına yol açmaktadır (Sönmez ve ark., 2016).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarında akut atak döneminde C-Reaktif Protein (CRP), serum amiloid A, fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının yüksek olması nedeniyle akut faz yanıtından sorumlu tutulan sitokinler üzerine çalışmalar yapılmıştır (Öktem ve ark., 2004; Çobankara ve Balkarlı, 2011). İnterlökin-1beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin serum düzeyleri sağlıklı bireylerle kıyaslandığında AAA hastalarında akut atak döneminde yüksek bulunmakla birlikte hastaların atak arası dönemlerinde de yüksek bulunmuştur (Balkarlı ve ark., 2016).

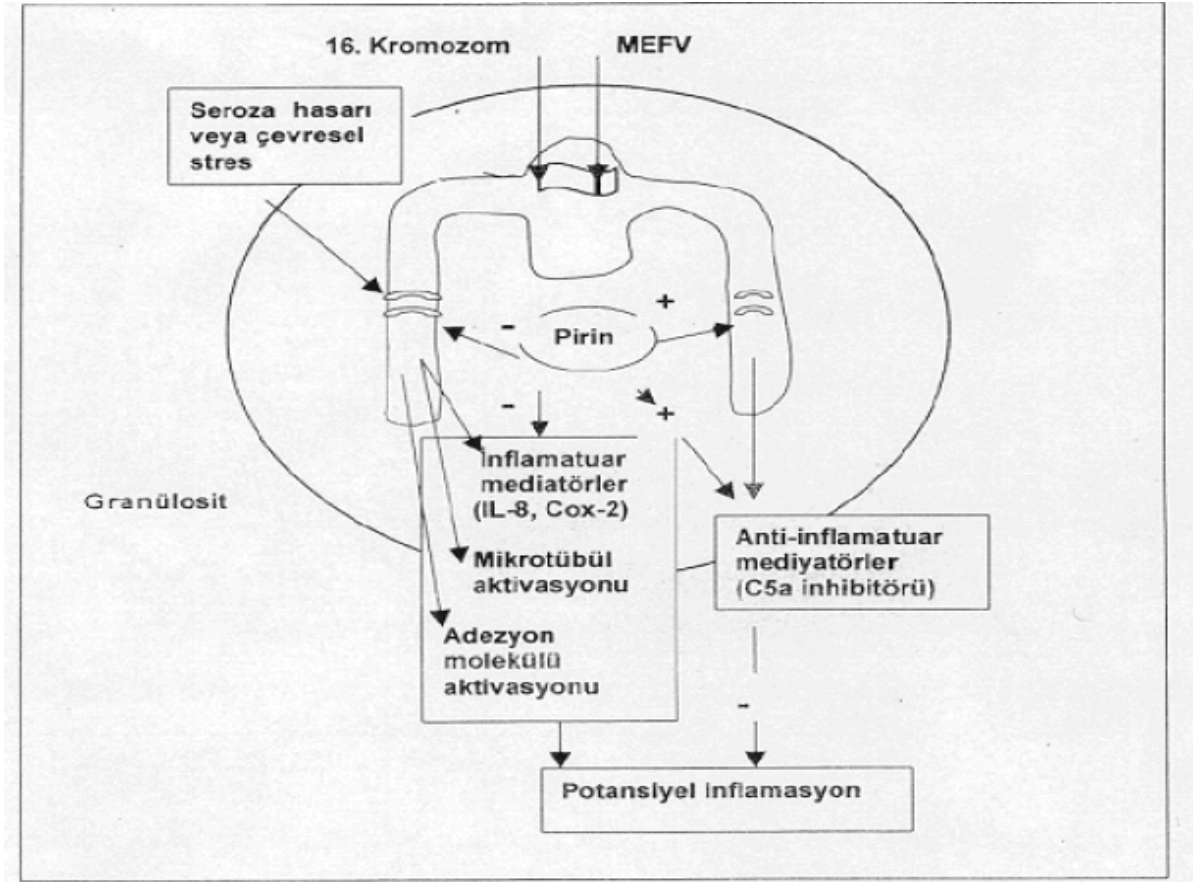
Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının patogenezi ile ilgili çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlardan bir tanesi AAA'nin doğuştan gelen bir hastalık olmasına inflamasyon araçlarının biyosentezini içeren lipokortin bir proteinin eksikliğinin sebep olmasıdır. Diğer hipotez ise hastalığın, C1 esteraz inhibitör eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal anjiyo ödem gibi inflamasyon yanıtın düzenlenmesinin engellenmesinin kalıtsal olarak eksikliğinden olabileceğidir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

Matzner, (1995); Samuels ve ark., (1998) tarafından yapılmış olan çalışmada hastalığın anormal katekolamin metabolizması ile ilgili olduğu belirtilip sempatomimetik bir ajan olan metaraminol infüzyonu ile AAA'ya benzer semptomlar oluşturularak plazma dopamin beta hidroksilaz düzeyi ölçülmüş ve AAA hastalarında yüksek olduğunu tespit etmiştir. Ancak bu görüş katekolamin metabolizmasının doğuştan gelen bir bozukluk olmaması nedeniyle geçersiz kabul edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda AAA'da fagosit fonksiyonunun gerçekte normal olduğu gösterilmiş; yalnızca önemli farklılık normal ve AAA'ya ait fagositler karşılaştırıldığında 42-46 °C'de inkübasyon altında AAA nötrofillerindeki lizozimlerin normalden fazla dağılım göstermiş olduğu, gelişmiş kemilemünesansta atak süresince fagosit kemotaksisinin arttığı bildirilmiştir (Matzner, 1995).

Yapılmış olan bazı laboratuvar çalışmalarında AAA hastalarında, hastalıkla ilgili olası otoimmün mekanizmalardan kaynaklandığı varsayılan immunolojik anormallikler

görülmüştür. Fakat bu değişikliklerin AAA patofizyolojisine ait birincil değişiklikler olmayıp, ikincil değişiklikler olabileceği bildirilmiştir (Samuels ve ark., 1998). Hastaların serum immunoglobulinlerinde poliklonal artış olmasının yanı sıra, yapılmış in vitro çalışmalarda atak süresince proinflamatuvar sitokin olan interlökin 1 ve tümör nekroz faktör alfa indüksiyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Samuels ve ark., 1998; Baykal ve ark., 2003).

AAA atakları iltihaplı bölgelere büyük bir polimorfonükleer lökosit akışı olması ile karakterizedir (Bhat ve ark., 2007). C5a kompleman ve interlökin 8 (IL-8) büyük inflamasyon araçları olup, sinoviyal ve peritoneal sıvılarda bulunarak inflamasyonun engellenmesinde görev yaparlar. AAA hastalarının eklem ve peritoneal sıvılarında C5a/IL-8 inhibitör aktivitesine rastlanmamıştır. Bu nedenden dolayı AAA'da meydana gelen akut ataklara inflamasyon düzenleyicilerindeki eksikliğin sebep olabileceği bildirilmiştir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Matzner, 1995; Bhat ve ark., 2007). AAA'nın patogenezinin şematik gösterimi Şekil 1.2. 'de verilmiştir (Samuels ve ark., 1998).



Şekil 1.2. AAA'nın patogenezini (Samuels ve ark., 1998)

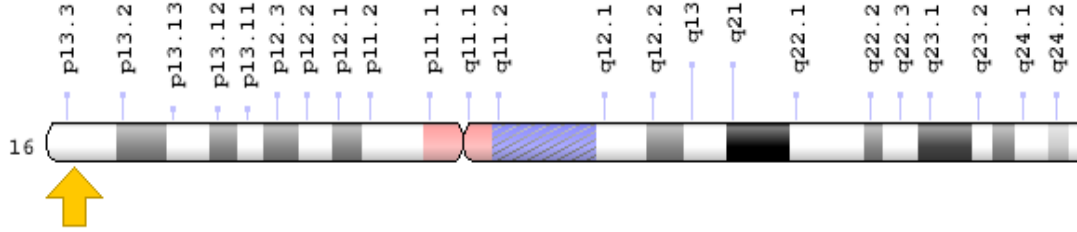
Şekil 1.2.'ye göre AAA'da seroza hasarı ve çevresel stres gibi durumlarda hastalığı taşıyıcı olarak bulunduran bireylerde pyrin protein görevini yerine getirebilir ve anti-inflamatuvar olaylar gerçekleşerek lökosit göçü kontrol edilebilir ve hastalığa ait belirtiler ortaya çıkmaz. AAA hastalarında ise seroza hasarı ve çevresel stres gibi durumlarda pyrin protein mutasyonlar nedeniyle görevini yerine getiremediği için anti-inflamatuvar araçlar baskılanır, C5a kompleman inhibitör eksikliği gibi durumlar meydana gelerek serozal bölgelere lökosit göçü meydana gelir ve inflamasyon görülür (Samuels ve ark., 1998).

1.5. Genetik

1.5.1. MEFV geni

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında mutasyonlara sebep olan gen MEFV(MEditerranean FeVer), 1997 yılında birbirinden bağımsız iki konsorsiyum; Uluslar arası FMF konsorsiyumu (Amerika, İsrail, Avustralya gibi ülkelerden oluşmuş) ve Fransız FMF konsorsiyumu (Fransa'daki çeşitli laboratuvarlar ve İsrail'deki doktorlardan oluşmuş) tarafından pozisyonel klonlama yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır (Centola ve ark., 1998; Ben-Chetrit ve Levy, 1998). MEFV genini tespit etmek için ilk olarak Askenazi olmayan Yahudi ailelerinde kromozom spesifik genin belirlenmesi amacı ile 100'den fazla polimorfik marker (işaretleyici) kullanılmıştır. Bu çalışmadan sonra MEFV geninin yeri 16. kromozomun kısa kolunda hemoglobin alfa genine göre sentromerik yerleşimli bulunduğu Askenazi olmayan Yahudi ailelerinde doğrulandıktan sonra, Ermeni, Arap ve Türk aileleri gibi diğer toplumlarda da doğrulanmıştır (Samuels ve ark., 1998). MEFV geni, kromozomda 250 kilobazlık aralıkta D16S468/D16S3070 telomerik bölge ile D16S3275 sentromerik bölge sınırları arasında bulunmaktadır (Balow ve ark., 1997). MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu Şekil 1.3.'te gösterilmiştir (NCBI, 2018). 15 kilobazlık MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3. bölgesinde bulunup, 10 ekzon bölgesinden oluşmakta, 3505 nükleotid uzunlukta ve 781 amino asit içeren Fransız grubun Latince Akdeniz'in adı olan Marenostriin olarak adlandırdığı, Uluslar arası konsorsiyumun Yunanca ateş anlamına gelen Pyrin olarak adlandırdığı proteini kodlamaktadır (Cazeneuve ve ark., 1999; Akar ve ark., 1999; Touitou, 2001; Peynircioglu ve Yılmaz, 2006; Öztürk ve ark., 2012). MEFV geninin ifadesi başlıca granülositler yani olgun nötrofillerde olup, inflamatuvar ve immun yanıtın oluşmasında önemli rol

oynamaktadır. Genin rolü ile ilgili bu görüşü, AAA hastalarında tekrar eden ataklarda inflamasyon görülmesi desteklemektedir (Bernot ve ark.,1998; Matzner ve ark., 2000; Dodé ve ark., 2000).



Şekil 1.3. AAA geninin (MEFV) 16. kromozomdaki konumu (NCBI, 2018)

Yüksek düzeyde korunmuş genler ailesinin üyesi olan 3.7 kilobazlık MEFV tamamlayıcı DNA (cDNA), embriyonik gelişim, hematopoez, onkogenez ve inflamasyon düzenleyici nükleik asit bağlı proteinleri ve nükleer efektör molekülleri içermektedir (Centola ve ark., 2000). Dizi 1.1.'de MEFV genine ait cDNA dizisi gösterilmiştir (NCBI, 2018).

```

1 ggaagccaga cagctggctc gagcctctcc tgctcagcac catggctaag acccctagtg
61 accatctgct gtccaccctg gaggagctgg tgccctatga cttcgagaag ttcaagttca
121 agctgcagaa caccagtgtg cagaaggagc actccaggat cccccggagc cagatccaga
181 gagccaggcc ggtgaagatg gccactctgc tggtcaccta ctatggggaa gagtacgccg
241 tgcagctcac cctgcaggtc ctgcgggcca tcaaccagcg cctgctggcc gaggagctcc
301 acagggcagc cattcaggaa tattccacac aagaaaacgg cacagatgat tccgcagcgt
361 ccagctccct gggggagaac aagcccagga gcctgaagac tccagaccac cccgagggga
421 acgaggggaa cggccctcgg ccgtacgggg gcggagctgc cagcctgcgg tgcagccagc
481 ccgagggccg gagggggctg tcgaggaagc ccctgagcaa acgcagagag aaggcctcgg
541 agggcctgga cgcgcagggc aagcctcggc cccggagccc ggccctgccg ggcgggagaa
601 gccccggccc ctgcagggcg ctagaggggg gccagggcga ggtccggctg cgcagaaacg
661 ccagctccgc ggggaggctg caggggctgg cggggggcgc cccggggcag aaggagtgca
721 ggcccttcga agtgtacctg ccctcgggaa agatgacgacc tagaagcctt gaggtcacca
781 tttctacagg ggagaaggcg cccgcaaadc cagaaattct cctgactcta gaggaaaaga
841 cagctgcgaa tctggactcg gcaacagaac cccgggcaag gccactccg gatggagggg
901 catctgcgga cctgaaggaa ggccctggaa atccagaaca ttcggtcacc ggaaggccac
961 cagacacggc tgcgagtccc cgctgccacg cccaggaagg agaccagtt gacggtacct

```


1021 gtgtgCGTga ttCctgcagc ttccccgagg cagtttctgg gcacccccag gcctcaggca
1081 gccgctcacc tggctgcccc cggtgccagg actcccatga aaggaagagc ccgggaagcc
1141 taagccccca gccctgcca cagtgtaaGC gccacctgaa gcaggTccag ctgctcttct
1201 gtgaggatca cgatgagccc atctgcctca tctgcagtct gagtcaggag caccaaggcc
1261 accgggtgCG cccattgag gaggtcggcc tggaacacaa gaagaaaatt cagaagcagc
1321 tggagcatct gaagaagctg agaaaatcag gggaggagca gcgatcctat ggggaggaga
1381 aggcagtgag ctttctgaaa caaactgaag cgctgaagca gcgggtgCag aggaagctgg
1441 agcaggTgta ctacttCctg gaacagcagg agcatttctt tgtggcctca ctggaggacg
1501 tgggCagat ggttgggCag atcaggaagg catatgacac ccgCgTatcc caggacatcg
1561 ccctgctcga tgcgctgatt ggggaactgg aggccaagga gtgCcagTca gaatgggaac
1621 ttctgcagga cattggagac atcttgCaca gggctaagac agtgCctgtc cctgaaaagt
1681 ggaccactcc tcaagagata aaacaaaaga tccaactcct ccaccagaag tcagagtttg
1741 tggagaagag cacaaaGtac ttctcagaaa ccctgcgttc agaaatggaa atgttcaatg
1801 ttccagagct gattggcGct caggcacatg ctgttaatgt gattctggat gcagaaaccg
1861 cttaccccaa cctcatcttc tctgatgatc tgaagagtgt tagacttggA aacaagtggg
1921 agaggctgCc tgatggcccG caaagatttg acagctgtat cattgttctg ggctctccga
1981 gtttcctctc tggccgcccG tactgggagg tggaggTtgg agacaagaca gcatggatcc
2041 tgggagCctg caagacatcc ataagcagga aagggaacat gactctgtcG ccagagaatg
2101 gctactgggt ggtgataatg atgaaggaaa atgagtacca ggCgtccagc gttccccga
2161 cccgCctgct aataaaggag cctcccaagc gtgtgggcat cttcgtggac tacagagttg
2221 gaagcatctc cttttacaat gtgacagcca gatcccat ctatacttc gccagctgct
2281 ctttctctgg gcccttcaa cctatcttca gcctgggac acgtgatgga gggaagaaca
2341 cagctcctct gactatctgt ccagTgggtg gtcaggggC tgactgaatg cccaactg
2401 catctctctt cctgcttctg gccttgTatc ttgcattcac actcaatagt cacggaatgc
2461 cgactaggTg ctagctgcta tgggaaatgc aaaaataaca aaatagttac tgtgcccagc
2521 gagcctaccC gattatagca gaggtaaGtt aggaacgaac atgttagtca atccgggtga
2581 agacatgtac tgatgacaca ccatggattt cagaggagga agtacggagt cgttgcataa
2641 tccgcccctg gtgggtggca ctctcaggtg ctCctgaaca gaagatttgg ccctcatttt
2701 ccctcagaac cccacggcaa ggatatatgt ccccttgTtc tctctgcttc tgtcttgagg
2761 atatgggaag ctagagaaa cgcaagcaga ctggattggg atagaagtat ttgtgtacct
2821 ggattaatga actatgattt tttttttttt tttttgagac caaatcttgc tctgtggccc
2881 aggctggagt gcagtggcac gatctcagct cactgcaacc tccacctccc aggttcaagc
2941 gattctcctg cctcagcctc ctgagcagct gggattacag gtgcgtgcca ccacaccagg

3001 ctggttttct tgtattttta gtagagacgg gggtttcacc atgtagcca ggctgggtctc
3061 gaactcctga cctcaggtga tccaccgcc tcagcctccc aaagtgctgg gattacaggc
3121 atgagccact gtgcccggcc tatgattctt tttttttttt ttttttgaga caaagttttg
3181 ctcttgtcac ccaggctgga gtgcagtggg gcaatcttgg ctactgcaa cctccgcctc
3241 ccaggttcaa gagattctcc tgcctcagcc tccgaagtag ctgggattac aggcgcccgc
3301 caccatgccc ggctaatttt ttgcattttt agtagacatg aggtttcatc atgttgcca
3361 ggccgggtctc aaactcctga cctcaggtga tgcaccacc tcagcctccc aaagtgcagg
3421 gattacaggc atgagccacc atgcctggcc atgattctta agagaattga ctgggcctca
3481 tgaataaaaa aattagaaaa tctaaaaaaaa a

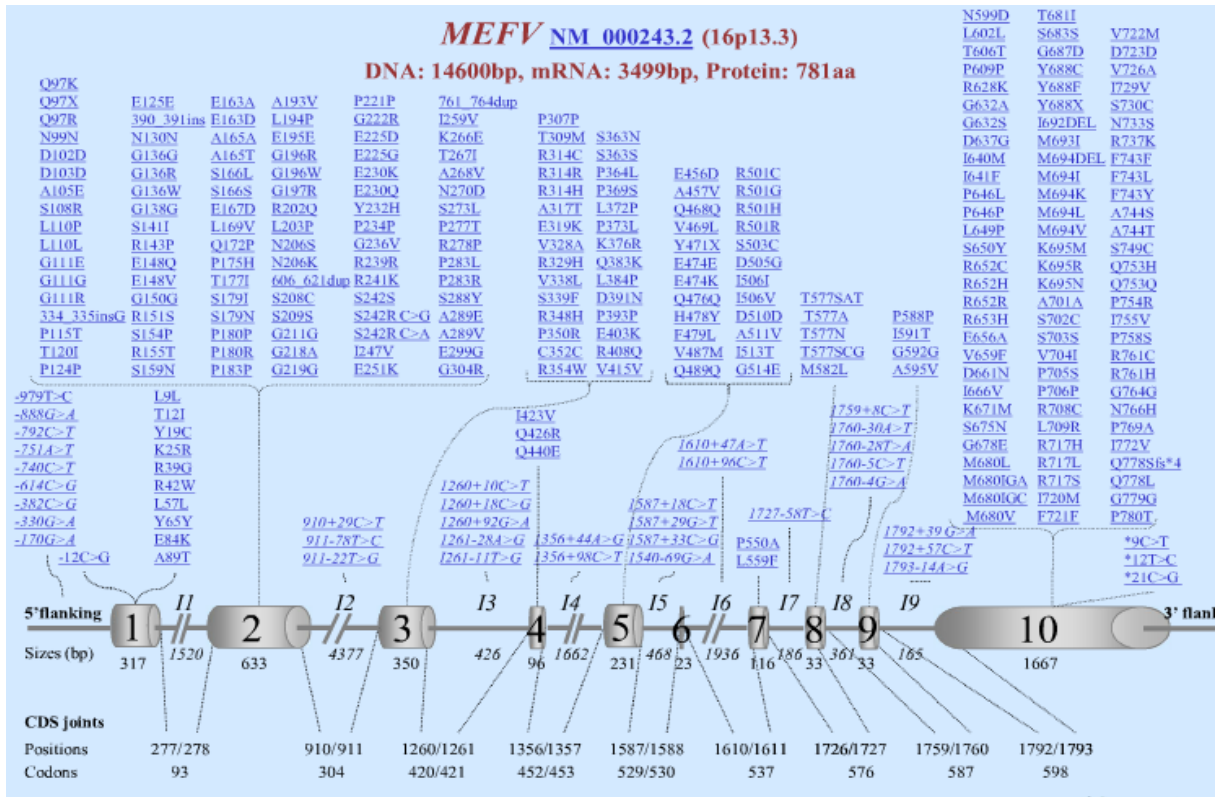
Dizi 1.1. MEFV genine ait cDNA dizisi

1.5.2. MEFV geni mutasyonları

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sebep olan MEFV geninin klonlanması ile birlikte üçtane yanlış anlamlı (missense) mutasyon M680I, M694V ve V726A ekzon 10 bölgesinde tanımlanmıştır (The International FMF Consortium, 1997; Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Touitou, 2001). İlk mutasyon olan M680I mutasyonu, 2040. nükleotidde guanin yerine sitozin nükleotidin değişmesi sonucunda (transversiyon) metiyonin amino asidi yerine izolösin geçmesi ile meydana gelmiş bir mutasyondur (The International FMF Consortium, 1997). M680I mutasyonu yaygın olarak Ermeniler ve Türklerde görülmekle birlikte, klinik olarak erken çocukluk döneminde ciddi olarak tekrarlayan ateş görülmesi ile karakterizedir (Salehzadeh, 2015). İkinci olarak görülen M694V mutasyonu, adenin ile guaninin yer değiştirmesi sonucunda (transisyon) 2080. nükleotidde metiyonin amino asidi yerine valin geçmesi sonucunda oluşmuştur (The International FMF Consortium, 1997). M694V mutasyonu, Ermeniler, Askenazi olmayan Yahudiler, Araplar ve Türkler arasında en yaygın görülen mutasyon olup, görülme sıklığı %20-%65 arasında değişmektedir (Touitou, 2001). M694V mutasyonu diğer mutasyonlarla kıyaslandığında klinik belirtilerin en ciddi şekilde görüldüğü mutasyondur. Hastalığın erken yaşta görülmesi, atakların sık tekrarlaması, atakların kontrol altına alınması için yüksek dozda kolşisine ihtiyaç duyulması ve tedavi edilmeyen hastalarda amiloidoz gelişiminin sık görülmesi ile karakterizedir (Önen, 2006). Üçüncü mutasyon olan V726A mutasyonunda timin ve sitozin bazlarının yer değiştirmesi sonucunda (transisyon) 2177. nükleotidde valin amino asidinin yerine alanin geçmesi sonucunda oluşmuştur (The International FMF Consortium, 1997). Mutasyon görülen toplumlarda V726A mutasyonun görülme sıklığının %38 olduğu bildirilmiştir (Touitou, 2001). Bu üç mutasyon ile birlikte ekzon 2'de görülen E148Q

mutasyonu en yaygın görülen mutasyondur (El-Shanti ve ark., 2006). Mutasyonların tanımlandığı bölgeler ekzon 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 ve 10 olup, ekzon 2 ve ekzon 10 fazla sayıda mutasyonun olması açısından mutasyonların sıcak noktalarıdır (Touitou, 2001; Infevers, 2018). Ekzon 2’de görülen E167D ve T267I mutasyonları; ekzon 3’te P369S mutasyonu; ekzon 5’te F479L mutasyonu; ekzon 10’da M694I, K695R, A744S, R761H, M694del ve I692del mutasyonları nadir olarak görülmektedir (Akar ve ark., 1999; Öztürk ve ark., 2012).

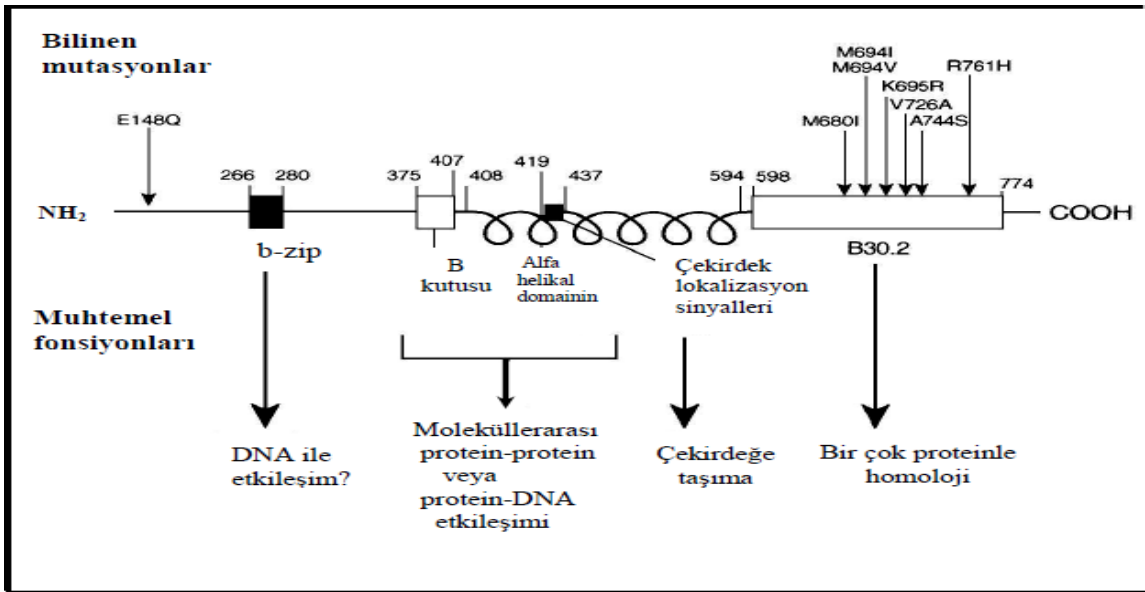
AAA’da yaygın görülen mutasyonlar amino asit değişikliği sonucunda meydana gelen yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. Yanlış anlamlı mutasyonların dışında duplikasyon, delesyon, çerçeve kayması (frame-shift) ve anlamsız (non-sense) mutasyonlar nadir olarak görülebilmektedir (Chae ve ark., 2009). Homozigot mutasyonlar, ciddi klinik belirtiler görülmesi açısından önemlidir. Homozigot mutasyonlarda hastalık başlangıç yaşının erken olması, yaygın olarak artrit görülmesi ve amiloidoz görülmesi bağlantılıdır (Salehzadeh, 2015). MEFV geninde bugüne kadar Infevers veri tabanında 300’den fazla mutasyon tanımlanmıştır (Infevers, 2018). MEFV geninde görülen mutasyonların ekzonlara göre dağılımı Şekil 1.4.’te gösterilmiştir (Infevers, 2018).



Şekil 1.4. MEFV geninde görülen mutasyonların ekzonlara göre dağılımı (Infevers, 2018).

1.5.3. Pysin/Marenostrin protein

Ailevi Akdeniz Ateşinden sorumlu MEFV geni tarafından kodlanan proteini Fransız grup Latince Akdeniz'in adı olan Marenostrin olarak adlandırmış, Uluslar arası konsorsiyum Yunanca ateş anlamına gelen Pysin olarak adlandırmıştır (Touitou, 2001). Pysin protein, 781 amino asit içeren, 86 kDa ağırlığında, lizin ve arginin amino asitlerince zengin olup, pozitif yüklüdür (The International FMF Consortium, 1997; Touitou, 2001). Pysin protein, granüosit, monosit, dendritik hücreler, sinoviyal, peritoneal ve ciltten elde edilen fibroblastlarda ifade olup, güçlü proinflamatuvar sitokinlerin interlökin 1 beta (IL-1 β) gibi üretim ve salınımını düzenleyerek inflamasyon olayları ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır (Bakkaloğlu, 2003; Üstek ve ark., 2007; Notarnicola ve ark., 2009; Grandemange ve ark., 2011). Pysin protein beş farklı bölgeden meydana gelmiştir: PYRIN bölgesi, bZIP transkripsiyon faktör bölgesi, B-box bölgesi, proteinin yapısı α -helikal olan bölge, B30.2 bölgesi (Chae ve ark., 2009). Pysin proteinin yapısı ve mutasyon bölgeleri Şekil 1.5'te gösterilmiştir. Proteinde amino ucu $-NH_2$, karboksil ucu $-COOH$ ile gösterilmiştir (Samuels ve ark., 1998). Her bir bölge proteinde, protein-protein etkileşimi yoluyla ayrı bir rol üstlenmiş olup, hücre ölümünün (apoptozis) düzenlenmesi, sitokin salınımı, transkripsiyonel düzenleme, hücre iskeleti uyarımı yoluyla inflamasyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (Chae ve ark., 2009). Hastalığa ait yaygın görülen ekzon 10 mutasyonları pysin proteinin karboksil terminal ucunda B30.2 bölgesinde bulunmaktadır (Üstek ve ark., 2007).



Şekil 1.5. Pysin proteinin yapısı ve mutasyon bölgeleri (Samuels ve ark., 1998).

Pyrin proteinin B30.2 bölgesinde görülen AAA'ya sebep olan mutasyonlar ve inflamasyona IL-1 β ve NF- κ B gibi sitokinlerin kontrolsüz olarak aktifleşmesi neden olmaktadır (Chae ve ark., 2009). Hatalı pyrin nedeniyle, serozal bölgelerde artmış lökosit göçü meydana gelerek inflamasyon uyarılarındaki yanıtın uzaması ve uygun olmaması sonucunda inflamasyon görülür (Bakkaloğlu, 2003).

1.6. Klinik Belirtiler

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı tekrar eden ve kendi kendini sınırlayan ataklarda ateş ile birlikte karın ağrısı, artirit/artralji, kas ağrısı, göğüs ağrısı, eritem ve nadir olarak uzamış febril miyaljiye benzeyen ciddi miyalji, perikardit, akut orşit gibi klinik belirtilerin görüldüğü otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (Öztürk ve ark., 2012; Soriano ve Manna, 2012). AAA hastalarının %50'si ilk ataklarını yaşamın ilk yıllarında, %80'i 20 yaşından önce geçirmektedir (Matzner, 1994). Bu nedenle AAA çocukluk çağı hastalığıdır (Livneh ve Langevitz, 2000). AAA ataklarından 12-24 saat öncesine prodromal belirtiler olan, huzursuz hissetme, baş dönmesi, anormal tat alma, sinirlilik görülebilir (Manna ve ark., 2009). AAA'ya ait tipik ataklar yaklaşık olarak 24-72 saat arasında sürebilmekte ve herhangi bir tedavi olmadan kendiliğinden geçmektedir (Pras, 1998; Sağlam ve ark., 2013). Hastalar atak arası dönemlerde kendilerini iyi hissederler ve gelecek atağa kadar normal fonksiyonlarını yerine getirirler. Tekrar eden ataklar önceden tahmin edilemeyen, düzensiz aralıklarla olabilmektedir (Pras, 1998). Atakların sıklığı haftada bir, ayda 3-4 kez olabilmekte ya da daha az sıklıkta görülebilmektedir. Atakların ciddiyet ve sıklığı yaş ilerledikçe azalmaktadır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Duygusal stres, yorgunluk, enfeksiyonlar, yağlı yiyeceklerle beslenmek, menstruasyon, yoğun egzersiz ve soğuk ortamda bulunmak atakları tetikleyebilmektedir (Sağlam ve ark., 2013; Padeh ve Berkun, 2016). AAA hastalığında, MEFV genindeki mutasyonlara bağlı olarak görülen en ciddi komplikasyon amiloid A proteini birikiminden kaynaklanan amiloidoz görülmesidir (Cazeneuve ve ark., 1999; Bakkaloğlu, 2003). SAA1 $-a/a$ genotipi ile ilişkili olarak amiloidoz görülme riski yüksektir (Bakkaloğlu, 2003). AAA ile ilgili amiloidozda, başlıca böbrek fonksiyonları zarar görmekte klinik olarak nefrotik sendrom gelişmekte ve sonuç olarak kronik böbrek yetmezliği görülmektedir (Matzner, 1995; Bakkaloğlu, 2003). Kolşisin tedavisi, atakların sıklığı ve şiddetini azaltmanın yanı sıra amiloidozuda önlemektedir.

Hastalığıdaki klinik belirti ve semptomların görülme sıklığı, ateş %96, peritonit %91, plörit %57, artirit/artralji %45, erizipel benzeri eritem %13, amiloidoz %2 olarak belirtilmiştir. Diğer nadir görülen belirti ve semptomlar baş ağrısı, aseptik menenjit, perikardit, splenomegali, akut skrotum, febril miyalji, dağınık purpura ve proteinüri olarak sıralanabilir (Bakkaloğlu, 2003). AAA'ya ait klinik belirti ve bulgular Şekil 1.6'da gösterilmiştir (Samuels ve ark., 1998).

Hastalığa ait 3 fenotip tanımlanmıştır. Tip 1 fenotipte, serozit ve inflamasyonla seyreden tekrar eden kısa ataklarda ateş, peritonit, sinovit, plörit ve nadir olarak perikardit görülmektedir. Amiloidoz hastalığın en ciddi komplikasyonudur. Tip 2 fenotipte, asemptomatik olan bireylerde sadece amiloidoz klinik belirti olarak görülmektedir (Shohat ve Halpern, 2011). Tip 3 fenotipte ise iki MEFV mutasyonu olan sessiz homozigot ya da birleşik heterozigot durumlarında görülür ve herhangi bir klinik belirti ve sistemik amiloidoz yoktur. Ancak bu mutasyonlarda renal AA tipi amiloidoz gelişmesine yatkınlık vardır (Soriano ve Manna, 2012).

SIK GÖRÜLENLER

DİĞERLERİ

MEFV Mutasyonu olan hastalarda
belirti ve bulgular (% Olarak)

%96 Ateş

%57 Plörezi

%2 Amiloidoz

%91 Steril
Peritonit

%45 Artrit -
Artralji

%13 Erizipel /
Erizipel benzeri
eritem

Başağrısı

Aseptik
menenjit

Perikardit

Splenomegali

Poliarteritis Nodoza
Glomerülonefrit

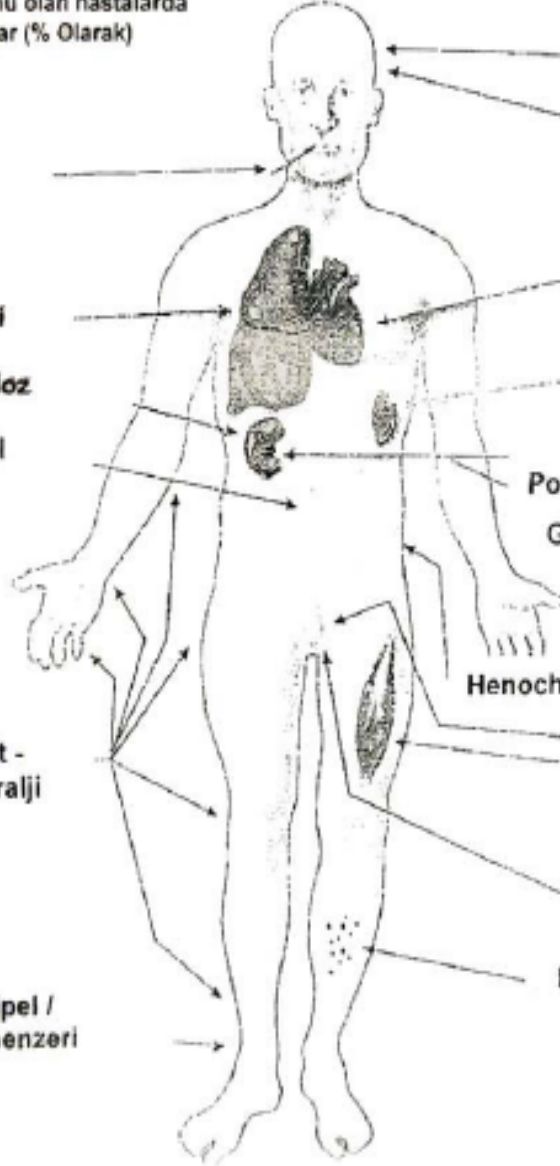
Henoch Schönlein purpura

Akut skrotum

Febril miyalji

Proteinüri

Purpura



Şekil 1.6. AAA'ya ait klinik belirti ve bulgular. Akut skrotum dışında belirtiler cinsiyet ayrımı yapılmadan gösterilmiştir. Atak süresince beyaz kan hücreleri (WBC), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve fibrinojen düzeyleri artabilir, mikroskopik hematüri ya da proteinüri görülebilir (Samuels ve ark., 1998).

1.6.1. Ateş

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında, akut ataklarda tekrar eden ateş başlıca belirti olup, çocukluk döneminde tek belirti olarak görülebilir (Shohat ve Halpern, 2011; Sağlam ve ark., 2013). Bazı hafif geçirilen ataklarda düşük derecede ateş görülmesine rağmen 38-

40°C'ye kadar artabilir. Hastaların %20-30'unda sıcaklığın artmasıyla titremede görülür. Ateş genellikle 12 saat ile 3 gün arasında değişen sürelerde devam etmektedir. Kolşisin tedavisi gören hastalarda atak esnasında ateş görülmeyebilir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

1.6.2. Karın ağrısı

Akut abdominal ataklar en yaygın görülen belirtiler arasındadır. Karın ağrısının fiziki muayenede karakteristik özelliği rebound hassasiyet, karın kaslarında sertlik, abdominal distansiyon ve peristaltik seslerde azalma olması bakımından yaygın peritonit tanısı ile uyumludur (Livneh ve Langevitz, 2000; Shohat ve Halpern, 2011; Padeh ve Berkun, 2016). Bölgesel ağrı apandisit ya da kolesistite benzemektedir. Daha az sıklıkta arka peritonyum etkilenmekte renal kolik ya da pelvik inflamatuvar hastalıklara benzemektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Akut abdominal ataklar süresince peristaltik hareketlerde yavaşlama olduğundan dolayı sıklıkla kabızlık, daha az sıklıkta ise ishal görülür (Samuels ve ark., 1998; Önen, 2006; Sağlam ve ark., 2013). Akut atak süresince çekilen abdominal filmde görülen sıvı düzeyleri ve ince bağırsakta görülen distansiyon ileusu düşündürmektedir (Livneh ve Langevitz, 2000). Belirti ve bulgular 24-48 saat arasında kendiliğinden geçse bile akut batın genellikle laparotomiye ve apendektomiye yol açar (Önen, 2006; Shohat ve Halpern, 2011). Bağırsaklarda hasar meydana gelebilir ve pelvik yapışıklık nedeniyle kadınlarda infertilite görülebilir (Sağlam ve ark., 2013).

1.6.3. Göğüs ağrısı

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının diğer sık görülen belirtisi plöreziden kaynaklanan göğüs ağrısıdır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Göğüs ağrısı atakları akut tek taraflı olarak ani başlangıçlı ateşli plörit olarak karakterize olup, göğüste ağrı ve etkilenen tarafta göğüs seslerinde azalma vardır. Göğüs röntgen filminde plevrada küçük sızıntılar ve hafif kalınlaşmalar görülmüştür (Shohat ve Langevitz, 2011; Padeh ve Berkun, 2016). Yapılan fizik muayenede sürtünme sesi ve perküsyonda titreşimsiz sesin durumuna göre değerlendirme yapılır. Göğüs ağrısı atakları tanısındaki zorluklardan bir tanesi perikardit ile karıştırılabilir. Ekokardiyografi çekilmesi tanının doğrulanmasına yardımcı olabilir (Livneh ve Langevitz, 2000). Belirtile genellikle 48 saat içinde kendiliğinden geçmekte bazen 1 hafta sürmektedir (Shohat ve Halpern, 2011; Sağlam ve ark., 2013).

1.6.4. Eklem ağrısı

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında görülen eklem tutulumları monoartirit olup, üç karakteristik özelliği vardır. İlk 24 saat içinde çok yüksek ateş ile birlikte görülmesi, bacadaki diz, ayak bileği, kalça gibi geniş eklemlerden birini etkilemesi, belirti ve semptomların pik yaptıktan sonra 24-48 saat içinde herhangi bir iz bırakmadan kendiliğinden geçmesidir (Shohat ve Halpern, 2011). Tekrar eden akut monoartirit ataklarında sıklıkla alt ekstremitelerin geniş eklemlerinde kızarıklık şişlik ve hassasiyet görülür. Daha az olarak üst ekstremiteler ve temporomandibular eklem gibi diğer eklemler etkilenmektedir (Livneh ve ark., 1996). Steril sinoviyal sıvı iltihap nedeniyle bulanık görünür ve artmış sayıda nötrofil içermektedir (Pras, 1998). Akut atak süresince çekilen X-Ray filmi kemiklerdeki değişiklik ile ilgili herhangi bir bilgi vermez. Kalça ekleminde tekrar eden aspirasyon ile osteonekroz ve cerrahi müdahale önlenmiş olmaktadır. Spondilartropati kolşisin tedavisine yanıt vermez fakat nonsteroid inflamatuvar ilaçlar ve antiromatizmal ilaçlar ile tedavi edilebilir (Samuels ve ark., 1998). Yetişkinlerde uzun süren (1 aydan fazla) artirit nadir olarak görülür ve eklemlerde hasara neden olabilir (Padeh ve Berkun, 2016). Travma ya da uzun süre egzersiz yapmak bacaklarda görülen artiriti tetiklemektedir (Sağlam ve ark., 2013). AAA'da görülen sakroileitte yaygın olarak diz ve kalça etkilenmektedir. Uzun süre devam eden kısa süreli ataklarda kalıcı hasar meydana gelebilir. Nadir görülen sakroileit bel ağrısı ile karakterize olup, genellikle HLA B27 negatif olan hastalarda görülür (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Başka nedenlerden dolayı ortaya çıkan ve AAA ile benzerlik gösteren aralıklı olarak görülen eklem ağrılarından oluşan monoartiküler ataklarda kristal birikimi ve enfeksiyon gibi durumları ortadan kaldırmak için eklem aspirasyonundan elde edilen kültürün incelenmesi gerekmektedir. Çocuklarda eklem ağrısı yaygın olarak görüldüğünden sistemik juvenil romatoid artirit tanısı da dikkate alınmalıdır. Juvenil romatoid artirit, tipik deri döküntüleri, lenfadenopati ve her gün ateş görülmesi ile karakterize olup, AAA'dan ayırt edilir. Uzun süre devam eden juvenil romatoid artirit genellikle kronik artirit ve radyolojik değişikliklere neden olur (Samuels ve ark., 1998).

1.6.5. Cilt belirtileri

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığında görülen cilt ile ilgili bulgular erizipel benzeri eriteme benzemektedir. Lezyonlar 30-35cm²'lik alanda keskin sınırlı kırmızı yama görünümünde olup, alt ekstremitelerde diz ile ayak bileği arasında ya da ayak yüzeyinde

yaygın olarak tek taraflı veya simetrik olarak görülmektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Samuels ve ark., 1998; Pras, 1998). Belirti olarak ateş ile birlikte ciltte kızarıklık, şişlik, hassasiyet bazende artralji görülmektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Padeh ve Berkun, 2016). Semptomlar hızla yoğunlaştıktan sonra 2-3 gün içinde kendiliğinden kaybolur (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

1.6.6. Nadir görülen semptomlar

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına ait nadir görülen belirti ve semptomlar vaskülit, perikardit, febril miyalji, splenomegali, akut skrotum, baş ağrısı ve aseptik menenjitir (Bakkaloğlu, 2003).

Vaskülitik hastalıklardan poliarteritis nodosa (PAN), Henoch-Schönlein purpura (HSP) ve Behçet hastalığı AAA ile birlikte görülebilmektedir. PAN, küçük ve orta arterlerde görülüp, immun kompleks birikimi, inflamasyon ve damar duvarının orta ve iç tabakasının nekrozu ile karakterizedir. Sıklıkla cilt vaskülitleri, miyalji, periferik nöropati, hipertansiyon, renal ve merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem ile ilişkilidir (Elgin ve ark., 2006). AAA ile birlikte görülen PAN'ın karakteristik klinik özelliği perirenal hematoma sebep olmasıdır (Özen ve ark., 2001). Çocukluk çağında görülen PAN önemli vaskülit olup, klinik olarak ateş ve sistemik tutulum göstermektedir (Yalçınkaya ve ark., 2007). Henoch-Schönlein Purpura (HSP), çocukluk çağında AAA ile birlikte en yaygın görülen küçük damarların vaskülitisi olup, trombositopenik purpura olmadan genellikle cilt ve gastrointestinal sistem etkilenmekte; karın ağrısı, artirit ve glomerulonefrit gibi belirtiler ile ortaya çıkmaktadır (Aksu ve Keser, 2011; Doğan ve ark., 2013; Altuğ ve ark., 2013). Normal sağlıklı bireylerle kıyaslandığında AAA hastalarında HSP ve PAN daha sık görülmektedir (Yazıcı ve ark., 2012). Behçet hastalığı (BD), atardamar ve toplardamarların her ikisinde etkileyen sistemik vaskülit olup, tekrarlayan oral aftöz ülserler, genital ülserler, cilt lezyonları ve üveit gibi belirtiler ile karakterizedir (Aksu ve Keser, 2011). Sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, BD olanlarda MEFV mutasyon sıklığı önemli oranda yüksek bulunmuştur (Taşlıyurt ve ark., 2013).

Perikardit, AAA'nın nadir görülen belirtisidir. Atak süresince görülen perikarditte genellikle sürekli olarak retrosternal göğüs ağrısı bulunmaktadır. Tanısında elektrokardiyografide (ECG) ST bölümünde yükselme, ekokardiyografide perikardiyal efüzyona ait bulgular görülür (Pras, 1998; Erken ve Erken, 2018).

Uzun süren febril miyaljide, yaygın olarak alt ekstremitelerde genellikle çift taraflı olarak fiziksel aktivite ve uzun süre ayakta durma gibi durumlardan sonra ortaya çıkan kas ağrısı görülür. Semptom olarak, uzun süren yüksek ateş, peritoneal iritasyon olmadan meydana gelen karın ağrısı, ishal, artirit/artralji, Henoch-Schönlein purpuraya benzer geçici vaskülitik kızarıklık görülebilir. Laboratuvar bulgusu olarak yüksek eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ile C-Reaktif Proteini (CRP), lökositozis ve hiperglobulinemi görülür. Tedavi edilmez ise semptomlar 6 hafta kadar sürebilir. Tedavide non-steroid antiinflamatuar ilaçlar ya da yüksek dozda prednizon etkilidir (Livneh ve Langevitz, 2000; Shohat ve Halpern, 2011; Padeh ve Berkun, 2016).

Splenomegali, artmış hemoliz ile ilişkili olup, infeksiyon ve inflamatuvar hastalıklara sebep olabilir (Marzouk ve ark., 2015). AAA hastalarının yaklaşık olarak %30'unda splenomegali görülmüştür. Bu durum amiloidoz ile ilişkili değildir (Önen, 2006).

Akut skrotum, AAA hastalarında nadir olarak görülmektedir. Akut skrotal inflamasyon, ergenlik çağı öncesinde erkek çocuklarında görülür. AAA'nın sebep olduğu skrotal ataklar, genellikle tek taraflı olup, semptom olarak dereceli olarak 12 saatten uzun süren ağrı ile birlikte skrotal şişlik, kızarıklık ve ödem, kasıkta ağrı ve hassasiyet görülmektedir (Samuels ve ark., 1998; Livneh ve Langevitz, 2000). İnflamasyondan dolayı tunika vaginalis görülmektedir (Livneh ve Langevitz, 2000). Testis torsiyonundaki karışıklıktan dolayı gereksiz cerrahi müdahale yapılabilir. AAA'nın sebep olduğu skrotal ataklarda sintigrafide hiperperfüzyon görülmektedir (Livneh ve ark., 1996).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarında, baş ağrısı ve aseptik menenjit gibi nörolojik belirtiler nadir olarak görülmekle birlikte kolşisin ile tedavi edilebilir (Shohat ve Halpern, 2011; Feld ve ark., 2012).

Tekrar eden AAA atakları süresince meydana gelen peritoneal yapışıklıklardan dolayı meydana gelen pelvik yapışıklıklar ve tubal hastalıklar nedeniyle kadın AAA hastalarında infertilite görülmektedir. Hamilelerde düzenli kolşisin kullanımı düşüklüğü ve peritoneal yapışıklıkları önlemektedir (Ben-Chetrit ve Levy, 2003).

1.6.7. Ataklar arası dönem

Akut ataklar arası dönemde kronik artiriti olan hastalar haricinde, hastalar genellikle asemptomatik olup, ateş ve inflamasyon gibi belirtiler görülmeyip, nadir olarak rahatsızlık

ya da ateş görülebilir (Samuels ve ark., 1998; Livneh ve Langevitz, 2000). Atak arası dönemde laboratuvar değerlerinde fibrinojen düzeylerinde artış, hafif anemi ve serum immunoglobulinlerde artış görülebilir (Samuels ve ark., 1998).

1.6.8. Amiloidoz

Serum amiloid A (SAA) protein, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ailesinden olan bir apolipoproteindir. Uzamış SAA yüksek plazma düzeyi nedeniyle dokularda amiloid A (AA) proteini birikerek, romatoid artirit, spondiloartropati, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, tüberküloz, kronik bronşit ve osteomyelit gibi kronik inflamatuvar hastalıklara sebep olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2003; Özkayar ve ark., 2012). Amiloid A proteini, karaciğer tarafından üretilen akut faz reaktanı olan serum amiloid A (SAA)'nın ayrılma ürünüdür (Bakkaloğlu, 2003). Ailevi Akdeniz ateşi hastalığında, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan en önemli komplikasyon MEFV genindeki mutasyonlara bağlı olarak görülen amiloid A (AA) proteini birikiminden kaynaklanan amiloidoz görülmesidir (Cazeneuve ve ark., 2000; Balcı ve ark., 2002; Bakkaloğlu, 2003; Özkayar ve ark., 2012). AAA'da görülen amiloidozda yaygın olarak, böbrekler, böbrek üstü bezi, karaciğer, bağırsaklar, dalak etkilenirken, daha az sıklıkta akciğer, tiroid, kalp, mide ve testisler etkilenmektedir (Samuels ve ark., 1998). AAA ile ilgili amiloidozda böbrek tutulumu baskın olup, amiloid fibrillerinin birikimi sonucunda hastalarda 2-13 yaşlarından sonra proteinüri başlayarak dereceli olarak nefrotik sendrom gelişmekte ve böbrek yetmezliğine sebep olmaktadır (Çakar ve ark., 2001; Özkayar ve ark., 2012; Sağlam ve ark., 2013). Amiloidoz gelişiminde etnik köken, MEFV geni mutasyonlarının türü, aile öyküsünde amiloidoz hikayesi olması, erkek hastaların kadın hastalara oranla yatkınlığının fazla olması önem taşımaktadır (Livneh ve Langevitz, 2000; Sağlam ve ark., 2013).

AAA hastalarında böbrek ile ilgili olmayan amiloidozda, klinik olarak, diyare, emilim bozukluğu, karaciğerde büyüme, sarılık, karaciğer enzimlerinde yükselme, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği gibi belirtiler görülmektedir (Livneh ve Langevitz, 2000). Rutin idrar tetkiki yapılması AAA hastalarında amiloidoz tanısı açısından önemlidir (Samuels ve ark., 1998). Tanıyı doğrulamak ve altında yatan nedeni anlamak için doku biyopsisi yapılması gerekmektedir (Livneh ve Langevitz, 2000). Bazı çalışmalarda amiloidoz tanısının doğrulanmasında kullanılan böbrek biyopsisi %88 duyarlılıkta iken, rektal ve kemik iliği biyopsisininin %75'e yakın duyarlılıkta olduğu bildirilmiştir (Sağlam ve

ark., 2013). Abdominal yağ dokusu aspirasyonu ve gingival biyopsi tanı açısından nadir olarak kullanılan başka yaklaşımlardır (Samuels ve ark., 1998; Sağlam ve ark., 2013).

Amiloidoz görülen hastalar genellikle normotansif ve nonhematüriktir (Bakkaloğlu, 2003) Kolşisin kullanımının yaygın olması, amiloidoz görülen hasta sayısında azalmaya sebep olmakla birlikte hemodiyaliz ve renal transplantasyonlu hastalarda yaşam süresini uzatarak nakledilen organda amiloid birikimini önlemektedir (Samuels ve ark., 1998; Bakkaloğlu, 2003).

1.7. Tanı Kriterleri

AAA hastalığının tanısı, genellikle klinik belirtilerde kısa sürede üç defa ateş ile birlikte serozit olan atak geçirilmesine ve doktor muayene bulgularına dayalı olmaktadır (Ben-Chetrit ve ark., 2002; Zadeh ve ark., 2011; Sağlam ve ark., 2013). Tanıyı destekleyici olarak, hastalık başlangıç yaşının 20 yaşından önce olması, aile hikayesinde amiloidoz ya da AAA olması, diğer periyodik ateşli hastalıkların olmaması, etnik köken ve kolşisine yanıt alınması gibi durumlar önem taşımaktadır (Nir-Paz ve ark., 2000; Sağlam ve ark., 2013). Hastalarda atipik klinik belirtiler varsa, hastalığa ait aile öyküsü yoksa, etnik köken belli değilse ve diğer periyodik ateşli hastalıklar ile AAA arasında ayırım yapılması gerekiyorsa ve tanının doğrulanması amacıyla MEFV genine ait mutasyon analizi yapılması gerekmektedir (Livneh ve ark., 1997; Bakkaloğlu, 2003; Önen, 2006). Klinik tanıda çeşitli tanı kriterleri mevcut olup, yaygın olarak kullanılan kriterler Tel Hashomer ve Livneh kriterleridir. Tel Hashomer tanı kriteri AAA'da en yaygın kullanılan tanı kriteridir. Pras'a ait olan diğer tanı kriterinde ise kısa süreli ateşli ataklarda serozit olması ve kolşisin tedavisine pozitif yanıt alınması gerekmektedir. Son zamanlarda ise Yalçinkaya ve arkadaşları tarafından yeni tanı kriteri tanımlanmıştır (Sağlam ve ark., 2013). Tel Hashomer tanı kriterine göre kesin tanı için 2 major kriter ya da 1 major kritere ek olarak 2 minör kriter bulunması; muhtemel tanı için ise 1 major kritere ek olarak 1 minör kriter olması gerekmektedir (Samlı ve ark., 2006). Tel Hashomer tanı kriteri Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir (Pras, 1998; Sağlam ve ark., 2013).

Çizelge 1.1. Tel Hashomer tanı kriterleri

Majör kriterler

-
- Tekrar eden ataklarda ateş ile birlikte peritonit, sinovit ya da plörit olması
 - Başka bir hastalığa bağlı olmayan AA tipi amiloidoz
 - Koşisin tedavisine yanıt alınması
-

Minör kriterler

-
- Tekrar eden ateşli ataklar olması
 - Erizipel benzeri eritem görülmesi
 - Birinci derece akrabalarda hastalığa ait öykü olması
-

Livneh tanı kriterinde kesin tanı için, en az bir majör kriter ya da en az minör kriter bulunması gerekmektedir. Çizelge 2.2.'de Livneh tanı kriterleri gösterilmiştir (Sağlam ve ark., 2013).

Çizelge 1.2. Livneh tanı kriterleri

Majör kriterler

-
- Peritonit (yaygın olarak)
 - Plörit (tek taraflı) ya da perikardit
 - Monoartrit (ayak bileği, diz, kalça)
 - Tek başına ateş olması
-

Minör kriterler

-
- İnkomplet ataklarda abdomen, akciğer, eklem gibi bir ya da daha fazla bölgenin etkilenmesi
 - Egzersiz ile bacakta ağrı olması
 - Koşisin kullanımına yanıt alınması
-

Yalçınkaya ve arkadaşlarının çocuk hastalardaki tanı kriterlerine göre kesin tanı için en az iki kriter bulunması gerekmektedir. Bu tanı kriterine göre ateşin, üç ataktan fazla

olması, 6-72 saat arasında görülmesi, koltuk altından ölçülen ateşin 38°C'den fazla olması, karın ağrısının, üç ataktan fazla olması, 6-72 saat arasında görülmesi, artiritin, üç ataktan fazla olması, 6-72 saat arasında görülmesi ve oligoartirit şeklinde olması, aile öyküsünde AAA hastalığının olması gerekmektedir (Sağlam ve ark., 2013).

1.7.1. Laboratuvar bulguları

Ailevi Akdeniz Ateşinde hastalıkla ilgili spesifik laboratuvar testi bulunmayıp, tanı klinik bulgulara dayanarak konmaktadır (Pras, 1998). Akut AAA atakları süresince beyaz kan hücreleri (WBC), serum amiloid A (SAA), fibrinojen, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), C Reaktif Protein (CRP), haptoglobin, C3 kompleman, C4 kompleman gibi akut faz reaktanlarında yükselme görülüp, atak arası dönemde değerler tekrar eski haline dönmektedir. Rutin idrar analizi normal olup, proteinüri ya da hematüri görülmesi klinik açıdan amiloidoz olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle AAA hastalarında rutin idrar tetkiki yapılması önem taşımaktadır (Lidar ve Livneh, 2007; Zadeh ve ark., 2011; Padeh ve Berkun, 2016). Uzun yıllar boyunca AAA hastalarında, sitokinler, kemokinler ve diğer inflamasyon ile ilgili proteinler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bunlar IL-1, 4, 5, 6, 10, 12, 18, TNF- α ve γ , sitokin ilişkili reseptörler, kompleman proteinler, yapışma molekülleri, büyüme faktörleri, immunoglobulinler ve geniş spektrumlu antikorlar olup, sonuç olarak AAA'nın otoimmün bir hastalık olmadığı görülmüştür (Lidar ve Livneh, 2007). Akut AAA atakları süresince, sitokinlere ait bulgular önemli olup, inflamasyon belirteçlerinden interlökin 1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörün salgılanımı artarken, interferon aktivitesinde azalma bulunmuştur (Livneh ve ark., 1996; Ben-Chetrit ve Levy, 1998). AAA ile ilgili sinovitte sinoviyal sıvı oldukça bulanık olup, sıvıdaki beyaz kan hücrelerinde (WBC) artış var iken, viskosite korunmuş olup, sterildir (Livneh ve ark., 1996). Serozal sıvılarda, özellikle peritoneal boşluktan elde edilen olmak üzere C5a kompleman aktivitesi azalmış bulunmuştur (Ben-Chetrit ve Levy, 1998).

1.7.2. Moleküler genetik tanı

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığından sorumlu olan MEFV geni, 16. kromozomun kısa kolunda tanımlandıktan sonra hastalığın tanısı güvenilir hale gelmiştir (Settin ve ark., 2007; Zadeh ve ark., 2011). İlk olarak MEFV genine ait yaygın görülen 5 yanlış anlamlı mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan M680I, M694V, M694I ve V726A mutasyonu 10. Ekzon bölgesinde, E148Q mutasyonu ise 2. ekzon bölgesinde bulunmaktadır (Zadeh ve ark., 2011). Bu mutasyonların yanında ekzon 1, 3, 5, 7, 8 ve 9

bölgelerinde de mutasyonlar tanımlanmıştır (Infevers, 2018). Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar, bir amino asitin yerine başka bir amino asit geçmesi sonucu protein değişikliği ile sonuçlanmaktadır. AAA'nın genetik geçişi, anne ve/veya babada hastalığın heterozigot ya da homozigot genotipte olmasının fenotipi etkilemesi gibi çeşitli durumlarla açıklanmaktadır (Bhat ve ark., 2007; Fonnesu ve ark., 2009).

Bugüne kadar hastalığa ait 300'den fazla mutasyon tanımlanmış olup, genetik tanı ile hastalığa ait ciddi klinik belirtiler ile fenotip-genotip ilişkisinin değerlendirilmesi mümkün olabileceği gibi spesifik mutasyonların belirlenmesi, hastalığa ait yeni yaklaşımların belirlenmesi ve tanının doğrulanması açısından önem taşımaktadır (Cazeneuve ve ark., 1999; Marek-Yagel ve ark., 2009; Infevers, 2018).

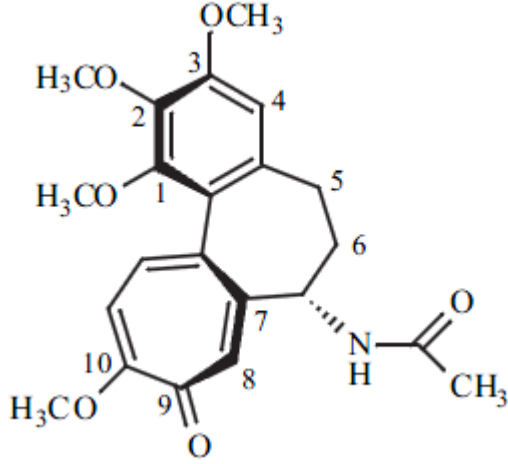
1.8. Tedavi

Colchicum, çayır safranının Latince adı olup, Karadeniz'in Doğu kıyısında Kolşis (Colchis) olarak adlandırılan bölgede yetiştirilmektedir. Çayır safranı (*colchicum autumnale*) bitkisi, Şekil 1.6.'da gösterilmiştir (Cerquaglia ve ark., 2005). Tedavi amacıyla kullanılan çayır safranı kolşisin olarak adlandırılmış ve ilk olarak M.Ö. 6. yüzyılda Tralles tarafından gut hastalığının tedavisi için tavsiye edilip, kullanılmıştır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Lidar ve Livneh, 2007). 1972 yılında Goldfinger kolşisinin AAA ataklarını önlemedeki etkisini açıklamıştır (Lidar ve Livneh, 2007).



Şekil 1.7. Çayır safranı (*colchicum autumnale*) bitkisi

Kolşisin, trimetoksifenil halkası, 7 üyeli bir halka, 7. pozisyonda asetamit ve bir tropolonik halka içeren trisiklik yapılu bir alkaloid olup, kimyasal formülü N-(5, 6, 7, 9, tetrahidro-1, 2, 3, 10, tetrametoksi-9 oksobenzo heptain-7-il) asetamit şeklindedir (Ben-Chetrit ve Levy, 1998; Cerquaglia ve ark., 2005). Kolşisinin kimyasal yapısı şekil 1.7.'de gösterilmiştir (Cerquaglia ve ark., 2005).



Şekil 1.8. Kolşisinin kimyasal yapısı

Moleküler ağırlığı 398 gr olan kolşisin, su ve eterde az çözünürken, etanol ve kloroformda serbestçe çözünebildiği için fizyolojik pH'da lipit yapılu bileşiklerde iyi çözünebilmektedir. Bu nedenle vücut dokularından geçişi hızlı ve kolay olmaktadır (Cerquaglia ve ark., 2005).

Kolşisin AAA hastalarında, akut atakları kontrol altına alarak atakların sıklığını azaltmakta, amiloidoz gelişmesini önlemekte ve yaşam kalitesini artırmaktadır (La Regina ve ark., 2013; Kara Eroğlu, 2015; Alghamdi, 2017). Yapılan çalışmalarda hamilelerde ve emzirme dönemi süresince düzenli kolşisin kullanımının güvenli ve etkili olabileceği bildirilmiştir (La Regina ve ark., 2013).

Kolşisin mitotik hücrelerde metafaz aşamasını engelleyen antimitotik bir ilaçtır. Tedavi edici etkisi, tubulinlere bağlanma kapasitesiyle ilgili olup, etkisini mikrotubullerde polimerizasyonu engelleyerek göstermektedir. Mikrotubullerde, hücresel düzenleme, sitokin ve kemokin salınımı, hücre göçü, iyon kanallarının düzenlenmesi, hücre bölünmesi gibi çeşitli hücresel işlemler meydana gelmektedir (Leung ve ark., 2015). Kolşisin oral alımdan sonra jejunum ve ileumdan absorbe olduktan sonra plazma düzeyi 2 saat içinde yüksek düzeye ulaşır. Karaciğerde metabolize olduktan sonra, oral dozun yalnızca %10-

25'i değişikliğe uğramadan idrarla atılmaktadır. İlacın hepatik metabolizması, demetilasyon ve sitokrom P450 (CYP450) sistemini içermektedir (Cerquaglia ve ark., 2005).

Kolşisin başlangıç dozu normal böbrek fonksiyonu olan çocuk hastalarda, günlük 0.5 mg, yetişkinlerde günlük 1 mg olup, tedavi sırasında oral kolşisin dozu geçici olarak artırılabilir ya da nonsteroid antiinflamatuvar (NSAID) ilaçlar ile birlikte kullanılabilir (Lidar ve Livneh, 2007; La Regina ve ark., 2013). Kolşisinin en sık görülen yan etkisi gastrointestinal belirtiler olup, kramp, karın ağrısı ve diyare görülebilmektedir (Lidar ve Livneh, 2007). Kolşisine dirençli hastalarda anti-IL1 tedavisi uygulanarak güvenli ve etkili bir şekilde inflamasyon kontrol altına alınabilir (Kara Eroğlu ve ark., 2015).

1.9. Genotip-Fenotip İlişkisi

Ailevi Akdeniz Ateş hastalığından sorumlu MEFV geninde başlıca beş mutasyon tanımlanmış olup, bunlar görülme sıklığına göre, ekzon 10'da bulunanlar, M694V, M694I, V726A ve M680I olup, ekzon 2'de ise E148Q mutasyonudur (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009; Özalkaya ve ark., 2011). Tekrar eden ataklarda klinik belirtilerin görülme sıklığı toplumlara göre farklılık göstermekle birlikte benzerlik bulunmaktadır (Düşünsel ve ark., 2008). En sık görülen klinik belirtiler, karın ağrısı %83, ateş %55, artirit veya artralji %43,5, plörite bağlı göğüs ağrısının %20 oranında olduğu bildirilmiştir (Düşünsel ve ark., 2008; Özalkaya ve ark., 2011). Türklere karın ağrısı en yaygın görülen belirti olup, bunu ateş, artirit, plörit ve erizipel benzeri eritem takip etmektedir (Düşünsel ve ark., 2008).

M694V homozigot mutasyonu hastalık belirtilerinin en ciddi görüldüğu genotip olup, erken başlangıç yaşı, atakların sık görülmesi, eklem ağrılarının fazla olması, hastalar arasında yüksek oranda amiloidoz görülmesi gibi klinik belirtilere sebep olmakta ve atakların kontrol altına alınması için yüksek dozda kolşisine ihtiyaç duyulmaktadır (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009). M680I homozigot mutasyonunda, klinik belirtiler hafif seyretmekle birlikte artirit ve amiloidoz görülme sıklığı düşüktür (Yalçınkaya ve ark., 2000). V726A ve E148Q mutasyonlarının amiloidoz görülmesi bakımından düşük risk taşıdığı bildirilmiştir. K695R (ekzon 10) ve P369S (ekzon 3) mutasyonlarının hafif fenotipik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Touitou, 2001).

M694V, M694I ve M680I taşıyıcılığı olan hastalarda, hastalığın ciddi görülmesi, eklem tutulumunun olması ve amiloidoz görülmesi bakımından yatkınlık bulunmaktadır (Ben-Chetrit ve Touitou, 2009).

1.10. Moleküler Tanımlama Yöntemleri

1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR), 1980 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmesiyle birlikte, moleküler biyolojide, tıpta tanı amacıyla, genom dizilemede, mutasyonların belirlenmesinde, gen ekspresyon çalışmalarında, patojenlerin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Booth ve ark., 2010; Ishmael ve Stellato, 2008). Polimeraz zincir reaksiyonu, deoksiribonükleik asitin (DNA) yüksek sıcaklığa dayanıklı *Thermus aquaticus* (Taq) bakterisinden izole edilmiş DNA polimeraz enzimi aracılığıyla çok sayıda kopyasının elde edildiği, moleküler fotokopi tekniğidir (Joshi ve Deshpande, 2011; Ishmael ve Stellato, 2008). PCR yöntemi, çabuk, ucuz, kolay uygulanabilmesi ve az miktarda DNA materyaline ihtiyaç olması nedeniyle yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Joshi ve Deshpande, 2011).

PCR uygulamasında 4 temel bileşen, yüksek sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz, nükleotid trifosfat, kan ya da dokudan elde edilen genomik DNA örneği, gen spesifik primer gerekmektedir (Ishmael ve Stellato, 2008). PCR, farklı sıcaklık koşullarında takip eden 3 önemli aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar, denatürasyon, yapışma ve uzamadır (Ishmael ve Stellato, 2008; Joshi ve Deshpande, 2011). İlk olarak, DNA yüksek sıcaklıkta (90-97°C arasında) denatüre olarak çift sarmalı açılır. Açılan DNA sarmalına spesifik primer bağlanır. Son olarak istenilen bölgenin polimerizasyonu gerçekleşir (Joshi ve Deshpande, 2011). Sonuç olarak DNA'nın kopya sayısı ikinin üssel katları olacak şekilde 2^n (n, döngü sayısı) çoğaltılır. PCR işlemi tamamlandıktan sonra, ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve Etidyum Bromür içeren boya ile muamele edilerek durumu incelenir. Parlak bant görülmesi istenmektedir. PCR yöntemi, genetik hastalıkların teşhisi için gen dizileme ile mutasyonların tespit edilmesi, kanser tanısı için onkogen mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerin tespit edilmesi gibi tıpta tanı amacıyla geniş kullanım alanına sahiptir (Ishmael ve Stellato, 2008).

PCR tekniğinde meydana gelen gelişmeler ile birlikte çeşitli yöntemler Ters (Reverse) PCR (RT-PCR), Nested PCR, Inverse PCR, Multipleks PCR geliştirilmiştir

(Bermingham ve Luetlich, 2003). Ters (Reverse) PCR yönteminde kalıp DNA yerine mRNA kullanılmakta ve klasik PCR yöntemiyle tamamlayıcı DNA'ya (cDNA, complementary DNA) çevrilmektedir (Ishmael ve Stellato, 2008). Nested PCR yönteminde, ard arda gelen iki PCR yapılmakta ve iki çeşit primer kullanılmaktadır. İkinci PCR ilk PCR ürününe ikinci primer çifti uygulanarak amplifiye edilmektedir. Nested PCR yönteminde, amplifikasyon sırasında istenmeyen primer bağlanması nedeniyle oluşabilecek kontaminasyonun önlenmesi istenmektedir. Başarılı bir yöntem olup, dizileme hakkında detaylı bilgi gerekebilir (Rahman ve ark., 2013). Multipleks PCR tekniğinde, kalıp DNA dizisini çoğaltmak için aynı reaksiyon kaşırımına farklı sayıda primer çifti eklenerek amplifiye edilir. Mutasyonların tespit edilmesi, delesyon, insersiyon belirlenmesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Bermingham ve Luetlich, 2003).

1.10.1.1. Real Time PCR (RT-PCR)

Real Time PCR, ilk olarak Higuchi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada PCR ürünlerini yaygın kullanılan floresan içerikli bir boya olan Etidyum Bromür ile ultraviyole ışık altında görüntülerken oluşan DNA miktarını video kamera aracılığıyla kayıt etmesi sonucunda ortaya çıkmıştır (Valasek ve Repa, 2005). Real Time PCR, amplifikasyonla aynı zamanlı olmak üzere enerji kaynağının uyarılması için floresan özellikli boyalar kullanılarak, amplifikasyon ürününün kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Valasek ve Repa, 2005; Ishmael ve Stellato, 2008; Solanki, 2012). Amplifikasyon süresince floresan ışımaya miktarı ile amplifikasyon ürün miktarı arasındaki ilişkiye bağlı olarak sinyal meydana gelmesinden dolayı kantitatif ölçüm yapabilme imkanı sunmaktadır (Valasek ve Repa, 2005; Valones, 2009). RT-PCR yönteminin, PCR ürünlerinin miktarının kantitatif olarak ölçülmesi, hızlı olması, diğer PCR prosedürlerinde olduğu gibi DNA amplifikasyonundan sonra elektroforeze ihtiyaç olmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Yöntem ile gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin kantitatif olarak ölçülebilmesi ile hastalıkların teşhis edilmesi, anlaşılması mümkün olacaktır (Solanki, 2012).

Real Time-PCR cihazı başlıca, ısı döngü cihazı, floresan algılama yapan optik sistem, dataları toplayıp analiz eden bilgisayar yazılımından meydana gelmiştir (Valones ve ark., 2009). Örnek, ısı döngü cihazına yerleştirilir ve her PCR döngüsü için sıcaklık ayarlanır. Örnek, enerji ile uyarıldığında meydana gelen floresan ışımaya her döngü için foto dedektör ile ölçülür (Valasek ve Repa, 2005).

Cihaz üç temel yolla floroforlar için uyarılma enerjisi sağlamaktadır. Bunlar tungsten veya halojen lambalar, ışık yayan diyot (LED) ya da lazerdir (Valasek ve Repa, 2005; Ishmael ve Stellato, 2008). Cihazda lambalar geniş kullanım alanına sahip iken, LED ve lazer nadir olarak kullanılmaktadır. Lambalar, belirli dalga boyunda uyarılan ışığı sınırlamak için filtre içermektedir. Veriler toplanırken, uygun dalga boyundaki emisyon enerjileri tespit edilmektedir. Dedektör olarak, şarj çiftli cihaz kamerası, foto çoğaltıcı tüpler ya da diğer tipteki foto dedektör kullanılmaktadır. Sınırlı dalga boyuna sahip filtreler ya da kanallar, foto dedektörle ölçüm yapılırken istenilen dalga boyuna geçiş yapmak için kullanılmaktadır (Valasek ve Repa, 2005).

Real Time-PCR cihazında sonuçlar, mutlak kantitasyon (standart eğri) ve bağıl kantitasyon olmak üzere iki metot kullanılarak kantitatif analiz edilir (Arya ve ark., 2005). Mutlak kantitasyonda (standart eğri), konsantrasyonu bilinen standartlar seri dilüsyon yapılarak kullanılır ve standart eğri oluşturulur. Oluşturulan lineer standart eğrinin C_t (döngü eşik değeri) değeri ile başlangıçtaki toplam RNA ya da cDNA miktarı ilişkili olup, bu metot ile konsantrasyonu bilinmeyen ürünün C_t değeri belirlenebilir (Wong ve Medrano, 2005). Bağıl kantitasyon ile karşılaştırmalı eşik döngü değeri olan C_t değeri belirlenmekte ve gen ifade düzeyi analizlerinde kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005; Wong ve Medrano, 2005; Schmittgen ve Livak, 2008).

Gen ekspresyonunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bu yöntem ile C_t değerleri belirlendikten sonra matematiksel eşitlik kullanılarak gene ait olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri hesaplanmakta ve gen ifade düzeyi belirlenmektedir (Schmittgen ve Livak, 2008). Bu metot ile standart eğri kullanımına ihtiyaç yoktur. Hedef genin bağıl ifade düzeyi, kontrol ya da kalibratör ile karşılaştırılarak hesaplanmaktadır. Kontrol referans (housekeeping) gen olarak, beta aktin, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz, glikolitik enzim kullanılabilir. Kalibratör olarak ise tedavi görmemiş örnek ya da normal dokudan elde edilen RNA kullanılabilir. Genellikle referans kontrol genler ifade düzeyleri sabit olduğu için tercih edilmektedir (Arya ve ark., 2005).

1.10.1.1.1. Real Time PCR’da kullanılan belirleme teknolojileri

Real Time-PCR teknolojisinde kullanılan belirleme teknolojileri, çift iplikli DNA’ya (dsDNA) bağlanan boyaların kullanıldığı özgül olmayan belirleme yöntemi ve sekans spesifik oligonükleotid problemlere spesifik olarak üretilmiş boyaların kullanıldığı özgül belirleme yöntemi olmak üzere iki çeşittir (Günel, 2007; Valones ve ark., 2009).

Hedefe Spesifik Olmayan Belirleme Teknolojisi

Hedefe spesifik olmayan belirleme teknolojisinde, SYBR Green boya en yaygın kullanılan boya olup, çift zincirli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışımaya yapmaktadır (Arya ve ark., 2005; Valones ve ark., 2009). Meydana gelen ışımaya miktarı çift iplikli DNA molekülünün konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır (Wong ve Medrano, 2005). Yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Boya bağlanması hedef diziyeye spesifik olmadığı için herhangi bir çift iplikli DNA molekülüne bağlanma olabilir veya istenmeyen primer-dimer ürün oluşabilir (Arya ve ark., 2005; Valones ve ark., 2009). Bu durum yanlış pozitif sonuç alınmasına sebep olmaktadır (Wong ve Medrano, 2005). Boyanın hedef DNA dizisine bağlandığını anlayabilmek ve primer dimer oluşumunu kontrol etmek için PCR reaksiyonu sonrasında erime eğrisi analizi yapılmaktadır (Wong ve Medrano, 2005; Valones ve ark., 2009). Erime eğrisi analizinde, amplifikasyon ürününün sıcaklığı artırıldığında çift iplikli DNA molekülünün birbirinden ayrılması (erime sıcaklığı, T_M) ile floresan boya DNA'dan ayrılır ve floresan ölçüm miktarı azalır (Arya ve ark., 2005; Valones ve ark., 2009). Bu analizin yapılmasının sebebi, PCR ürününün uzunluğunun ve diziliminin farklı olmasına bağlı olarak, DNA'ların farklı erime sıcaklığına sahip olmasından dolayı ayrı yerlerde pik vermesinden kaynaklanmaktadır (Günel, 2007).

Hedefe Spesifik Belirleme Teknolojileri

Taq Man Prob Teknolojisi

Spesifik DNA dizilerini belirlemek amacıyla floroforlar ile işaretlenmiş floresan ışımaya yapabilen oligonükleotid problemler kullanılmaktadır. 5' nükleaz aktivitesine sahip olan bu problemler hibridizasyon prob ya da yaygın kullanımıyla TaqMan prob olarak adlandırılmıştır (Valones ve ark., 2009). 25-30 nükleotid uzunluğunda dizilime sahip TaqMan probleminin 5' ucuna floresan raportör boya, 3' ucuna ise söndürücü olarak adlandırılan boyalar kovalent olarak bağlanmıştır (Arya ve ark., 2005; Mirmajlessi ve ark., 2016). Boyalar çeşitli olup, 5' ucunda, 6-karboksifloresin (FAM), tetrakloro-6-karboksifloresin (TET), heksakloro-6-karboksifloresin (HEX) ve VIC; 3' ucunda ise 6-karboksitetra metil rodamin (TAMRA) veya 4-(dimetilaminoazo)benzen-4-karboksilik asit (DABCYL) bulunmaktadır. Spesifik dizileri belirlemek amacıyla floresan sinyal oluşturmak için ilk olarak prob tamamlayıcı DNA zincirine bağlanmakta, sonrasında ise 5' nükleaz aktivitesine sahip DNA Polimeraz enzimi 5' ucunda bulunan FAM'ı probdan ayırmaktadır. Ayrılan FAM floresan sinyal oluşturmakta ve bu sinyal ölçülmektedir.

TaqMan Prob, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve farklı allellerin belirlenmesinde kullanılabilecek ideal bir yöntemdir (Arya ve ark., 2005; Wong ve Medrano, 2005).

Moleküler Boncuk Teknolojisi

Moleküler boncuk teknolojisindeki prob, saç tokasına benzeyen tek zincirli oligonükleotid hibridizasyon probudur (Mirmajlessi ve ark., 2016). Bu yöntemde moleküler boncuklar tek zincirli tamamlayıcı DNA molekülüne kovalent bağlı 5' ucunda floresan boya ve 3' ucunda ise söndürücü boya içeren proba bağlanmıştır (Arya ve ark., 2005). PCR esnasında prob hedef diziye bağlandığında boyalar birbirinden uzaklaşarak floresan ışımaya meydana gelmektedir. Probonun saç tokasına benzeyen yapısı diğer düz yapılı problemlerle karşılaştırıldığında spesifik olup, prob hedef moleküle bağlandığında termodinamik açıdan kararlı yapı meydana gelmektedir. Bu özelliklerden dolayı moleküler boncuk yöntemi allelik ayrımı ve nokta mutasyonların tanımlanabilmesi için kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005; Wong ve Medrano, 2005).

Akrep Primer Teknolojisi

Akrep primer teknolojisi, yapısal ve fonksiyon olarak moleküler boncuk teknolojisine benzemektedir (Valones ve ark., 2009). Akrep primerler proba kovalent olarak bağlanmış olup, prob saç tokasına benzemektedir. Probonun 5' ucu sap ilmek yapısında olup, florofor içermekte, 3' ucunda ise söndürücü bulunmaktadır (Arya ve ark., 2005; Mirmajlessi ve ark., 2016). PCR reaksiyonu süresince uzama aşamasında, akrep primerin bağlı bulunduğu prob hedef diziye bağlanmaktadır (Arya ve ark., 2005). Bağlanma sonucunda florofor ve söndürücü birbirinden ayrılarak floresan ışımaya meydana gelmektedir (Seifi ve ark., 2012). Bu yöntemdeki farklılık, saç tokası yapısının düğüm kısmıyla primerin 5' ucu arasında DNA sentezini durdurucu heksilen glikol grup bulunmaktadır. Heksilen glikol, saç tokasının düğüm kısmının açılmasını engellemektedir (Kaltenboeck ve Wang, 2005). Akrep primer teknolojisi, meydana gelen sinyallerin güçlü olması sebebiyle hassas bir yöntem olup, mutasyonların belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Mirmajlessi ve ark., 2016; Arya ve ark., 2005).

FRET Teknolojisi

Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET) problemleri teknolojisinde, iki tane oligonükleotid prob bulunmaktadır (Kaltenboeck ve Wang, 2005). Problemler, hibridizasyon problemleri ya da Light Cycler problemleri olarak da adlandırılmaktadır (Seifi ve ark., 2012). Bir

probonun 3' ucunda florofor verici (donor), 5' ucunda florofor alıcı (acceptor) bulunmaktadır. Verici prob 480 nm dalga boyunda ışığa yapabilen FAM gibi bir boya ile işaretlenmiş olup, alıcı prob ise uzun dalga boyunda ışığa yapabilen TAMRA, ROX gibi boya ile işaretlenmiştir (Kaltenboeck ve Wang, 2005). Problar hedef diziyeye bağlandığında, probun 3' ucundaki boya 5' ucundaki boya tarafından baskılanmaktadır. 5' ucundaki ikinci probun uyarılması sonucunda üçüncü dalga boyunda bir ışığa meydana gelmekte ve bu ışığa ölçülmektedir (Seifi ve ark., 2012). FRET problemlerinde, hedef diziyeye özgü iki probun aynı anda bağlanabilmesi nedeniyle yüksek spesifiklikte belirleme yapılabilmektedir (Kaltenboeck ve Wang, 2005).

1.10.2. DNA dizi analizi

Dizi analizi yöntemi hedef DNA, PCR ile amplifiye edildikten sonra saflaştırılmış DNA parçaları analiz edilmektedir (Nussbaum ve ark., 2007). DNA molekülünde bulunan adenin, guanin, sitozin, timin bazlarında meydana gelen değişiklikler incelenebilmektedir (Munshi, 2012). En yaygın kullanılan DNA dizileme tekniği Sanger dizi analizidir (Nussbaum ve ark., 2007). Sanger (dideoksi) yöntemi ile dideoksinükleotid trifosfat (ddNTPs) kullanılarak DNA dizisinin sonlandırılması amaçlanmaktadır. Sanger (zincir sonlandırma) yöntemi için, tek zincirli kalıp DNA, primer, DNA polimeraz, radyoaktif ya da floresan boya ile işaretlenmiş nükleotidler, DNA uzamasını durdurmak amacıyla ddNTPs gerekmektedir. DNA örneği dört farklı deoksiribonükleotid trifosfatın (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) birbirine bağlanması sonucunda meydana gelmiştir. Nükleotidler 3' hidroksil grubuna eklenerek zincir uzamasına sebep olmaktadır. Dideoksinükleotidlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) 3' karbonunda hidroksil grubu bulunmaması nedeniyle zincir sonlandırma reaksiyonlarında zinciri sonlandırmak amacıyla kullanılmaktadır (Munshi, 2012). Otomatik dizi analizi yapılırken ddNTP spesifik bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Kapiler elektroforez kullanılarak yapılan analizde boya ile işaretlenmiş parçalar, florofor özellikleri nedeniyle cihazın lazerinde dört farklı renkte ışığa yapmaktadır. Farklı renkte meydana gelen bazların dizilimi cihazda kromatogram olarak belirlenmektedir (Metzker, 2005). Dizi analizinde, genelde meydana gelen değişikliklerin detaylı olarak incelenebilmesi ile hastalıklara sebep olan mutasyonlar tespit edilerek uygun tedavi seçenekleri belirlenmektedir (Ravi ve ark., 2014).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Notarnicola ve ark., (2002), yapmış oldukları çalışmada, MEFV geninin mRNA düzeyi sağlıklı bireylerle kıyaslandığında AAA hastalarında düşük bulunmuştur. MEFV geninin mRNA ekspresyon düzeyinin mutasyon tipine göre azaldığı bildirilmiştir. Sağlıklı bireylerle kıyaslandığında asemptomatik taşıyıcı bireylerde MEFV geninin ifade düzeyi düşük bulunmuştur. M694V mutasyonu, diğer MEFV mutasyonlarıyla kıyaslandığında fenotip olarak hastalığın en ciddi ve en sık görülen genotipidir. Diğer mutasyonlarla kıyaslandığında M694V mutasyonun gen ifade düzeyi en düşük bulunmuştur. M694V homozigot mutasyonu olan hastalar ile sağlıklı kontroller arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Sağlıklı taşıyıcılar ile kıyaslandığında M694V mutasyonun ifade düzeyi düşük bulunmuştur. Hastalığın klinik belirtilerinin daha hafif görüldüğü E148Q mutasyonunda ise gen ifade düzeyi sağlıklı bireylerle kıyaslandığında biraz yüksek bulunmuştur. M694V mutasyonunda allel sayısındaki artış ile birlikte genin ifade düzeyinde azalma olduğu bildirilmiştir. AAA ile ilgili semptomları olan ve genetik açıdan mutasyon olan hastaların gen ifade düzeyleri sağlıklı bireylerle kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Marenostin protein pozitif otoregülasyon yoluyla, MEFV geninin ekspresyonunu düzenlemektedir. Marenostin aktivitesi hasar gördüğünde M694V mutasyonunda olduğu gibi pozitif otoregülasyon yolunun fonksiyonu bozulmaktadır. Bu durum MEFV geninin ifade düzeyinin düşük olmasına yol açmaktadır. Sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında AAA hastalarında hastalığın belirtisiz dönemlerinde de gen ifade düzeyleri düşük bulunmuştur. AAA atakları süresince inflamasyon uyarıcıları MEFV ifade düzeyinde artışa sebep olmaktadır. Negatif geri besleme döngüsündeki yetersizlik nedeniyle inflamatuvar süreçte azalma olmaktadır. MEFV geninin ifade düzeyi ile genotip-fenotip arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bulunan sonuçlar AAA hastalarında MEFV geninin transkripsiyonel yolunun yanlış olarak düzenlenmesi sonucunda hastalığın patofizyolojisine ait genin ifade düzeyinde kantitatif bozukluk olmasına dayanmaktadır.

Üstek ve ark., (2007), tarafından yapılan çalışmada, klinik belirtisi olmayan hastalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genin ifade düzeyi asemptomatik hastalarda önemli ölçüde düşük bulunmuştur. MEFV geninin ekspresyon düzeyi, asemptomatik dönemle kıyaslandığında AAA hastalarında atak süresince düşük bulunmuştur. MEFV geninin azalmış ekspresyon düzeyinin inflamasyonla ilgili olabileceği ve pyrin proteininde, hastalıkla ilgili meydana gelen değişikliğin AAA hastalarında inflamasyon atakları olarak görülebileceği bildirilmiştir. Bulunan sonuçlar ile pirin proteininin başlıca fonksiyonunun

inflamasyonu önlediği ve inflamasyonun negatif düzenleyicisi olduğu doğrulanmıştır. Pypin proteinin ekspresyonunda meydana gelen azalma sonucunda inflamasyon yolunun düzenlenmesinde bozukluk olabileceği bildirilmiştir.

Booty ve ark., (2009), tarafından yapılan çalışmada, önceki iki çalışmanın aksine MEFV geninin ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında hastalarda yüksek bulunmuştur. Meydana gelen farklılığın, kullanılan örnek türünün farklı olması, RT-PCR yönteminin farklı olması, reaksiyonda kullanılan kimyasal ve primerlerin farklı olması ve verilerin analiz yönteminin farklı olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

Kireçtepe ve ark., (2011) çocuk hastalar ile yapmış oldukları çalışmada, Türk toplumunda yaygın görülen E148Q, M680I, M694V, M694I ve V726A mutasyonları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Notarnicola ve ark., (2002) yapmış olduğu çalışma, Üstek ve ark., (2007) yapmış olduğu çalışma ile uyumlu olup, MEFV geninin ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında AAA hastalarında önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Genetik açıdan mutasyon olan hastalar ile mutasyon olmayan hastalar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Mitroulis ve ark., (2011), yapmış oldukları çalışmada, MEFV geni ekspresyon düzeyi sağlıklı bireylerle kıyaslandığında AAA hastalarında düşük bulunmuştur.

Tozkır ve ark., (2014), yapmış oldukları çalışmada bulunan sonuçlar, Notarnicola ve ark., Üstek ve ark., Kireçtepe ve ark., bulmuş oldukları sonuçlar ile uyumludur. MEFV geninin mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında MEFV geninde mutasyon olan çocuk AAA hastalarda düşük bulunmuştur. Bu çalışmada, MEFV geninde mutasyon olmayan fakat klinik açıdan hasta olan bireyler ile MEFV geninde mutasyon olmayan kontrol grubu kıyaslanmış ve MEFV geni ekspresyon düzeyinde önemli bir farklılık bulunmamıştır. MEFV geninde heterozigot mutasyonu olan taşıyıcılar ile mutasyon olmayan kontroller kıyaslandığında MEFV geni ekspresyon düzeyinde önemli bir fark bulunmamıştır. Genetik açıdan mutasyon olan hastalar ile mutasyon olmayan hastalar kıyaslandığında MEFV geni ekspresyon düzeyinde görülen farklılık önemli bulunmuştur. M694V homozigot mutasyonu heterozigot diğer mutasyonlarla kıyaslandığında MEFV geni ekspresyon düzeyinde önemli bir fark bulunmamıştır. E148Q ve M694V heterozigot mutasyonları kıyaslandığında MEFV geni ekspresyon düzeyinde önemli bir fark bulunmamıştır. E148Q homozigot veya heterozigot mutasyonu olan hastalar diğer homozigot veya heterozigot MEFV mutasyonları olan hastalar ile kıyaslandığında MEFV geni ekspresyon düzeyinde önemli bir fark bulunmamıştır. Notarnicola ve ark. aksine MEFV geni ekspresyon düzeyi ile genotip-fenotip arasında

herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bu durumun çalışılan hasta sayısındaki farklılıktan kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesine başvurmuş olan ve Tel-Hashomer tanı kriterine göre Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı tanısı almış 47 olgu ve klinik tanı almayan 8 olgudan (kontrol grubu) aç karnına antekübital venden etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ) içeren tüpe vakutainer yoluyla alınan tam kan ile çalışılmıştır. Çalışma öncesinde Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulundan izin alınmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. DNA izolasyonu

Kan örneklerinin DNA izolasyonu Macharey Nagel kit (Genomic DNA from Blood, Germany) çalışma prosedürüne göre yapıldı. Kit prosedürü aşağıdaki gibidir.

Kan örneği karıştırıldıktan sonra 200 µl alınarak eppendorf tüpe konuldu ve üzerine 25 µl proteinaz K ve 200µl B3 çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Hazırlanan karışım termal blokta 70°C’de 10 dakika bekletildi. Sonrasında karışıma 210 µl saf etanol eklenerek karışım kolona aktarıldı. Kolon 11000g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra altta kalan kirli süzüntü tüpü atılarak tüp temiz toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 500 µl BW çözeltisi eklenip, 11000g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra altta kalan kirli süzüntü tüpü atılarak tüp temiz toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 600µl B5 çözeltisi eklendi ve 11000g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra altta kalan kirli süzüntü tüpü atılarak tüp temiz toplama tüpüne aktarıldı. Kolon boş olarak 11000g’de 1 dakika santrifüj edildi ve üzerine önceden ısıtılmış BE çözeltisinden 100µl eklenerek 1 dakika oda ısısında bekletildi ve 11000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan çözeltiden DNA elde edildi.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmada uyguladığımız PCR metodunda ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 10 için farklı karışımlar GML kit protokolüne göre hazırlanmıştır. Ekzon 2 için; PCR ile çoğaltma işleminde her bir numune için PCR tüpüne 7.5 µl GML PCR mix, 0.2 µl GML Taq

Polimeraz, 1.0 µl Exon 2 Primer Mix, 3 µl G/C Enhancer, 2 µl Distile su ve 1.5 µl Genomik DNA (20-60 ng/µl) eklendi ve karıştırıldı. Ekzon 3 için; PCR ile çoğaltma işleminde her bir numune için PCR tüpüne 7.5 µl GML PCR mix, 0.2 µl GML Taq Polimeraz, 1.0 µl Exon 3 Primer Mix, 3 µl G/C Enhancer, 2 µl Distile su ve 1.5 µl Genomik DNA (20-60 ng/µl) eklendi ve karıştırıldı. Ekzon 10 için; PCR ile çoğaltma işleminde her bir numune için PCR tüpüne 7.5 µl GML Master Mix, 1.0 µl Ekzon 10 Primer Mix, 3 µl G/C Enhancer, 2 µl Distile su ve 1.5 µl Genomik DNA (20-60 ng/µl) eklendi ve karıştırıldı. PCR işlemi Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR işlemi aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Süre
1	Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	10 dakika
2	Amplifikasyon (35 döngü)	95 °C 62 °C 72 °C	40 saniye 1 dakika 50 saniye
3	Son uzama	72 °C	7 dakika
4	Muhafaza	4 °C	∞

PCR işlemi Bio-Rad T100 Thermal Cycler ile yapılmıştır. Ekzonlarda kullanılacak primerler:

Ekzon 2; F: 5’CCACACAAGAAAACGGCACAGA3’, ve

R: 5’CTGGACTCGGCAACAGAACCC3’,

Ekzon 3; F: 5’AGACACGGCTGCGAGTCCC3’, ve

R:5’GGAGCATCTGAAGAAGCTG3’,

Ekzon 10; F: 5’GTTAATGTGATTCTGGATGCA3’, ve

R: 5’GGAGCATCTGAAGAAGCTG3’

baz dizilimine sahiptir.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

Jel elektroforezinde kullanılan Agaroz (Sigma-Aldrich, A.B.D) belirli yüzdelerde hazırlanmaktadır. Bu çalışmamızda biz PCR ürünlerini %1'lik agaroz jelde değerlendirdik. %1'lik agaroz jel için 1g agaroz tartılıp, 1×TBE tampon çözeltisi ile 100ml'ye tamamlandı. 1×TBE tampon çözeltisi 10×TBE tampon çözeltisinin 1/10 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 10×TBE tampon çözeltisi; 108 g Trizma (Sigma-Aldrich, A.B.D), 55 g Borik asit (Sigma-Aldrich, A.B.D), 40 ml EDTA (0.5 M, pH: 8) (Sigma-Aldrich, A.B.D) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) çözünmesi sağlandı. 15 dakika soğuması için bekletildikten sonra jel tabağına (OWL Easycast B2 Thermo Scientific, A.B.D) uygun tarak konulduktan sonra döküldü ve 30 dakika agarozun donması için beklendi. Agaroz donduktan sonra jel tabağı jel elektroforez tankına yerleştirildi. Jel tankı 1×TBE tampon çözeltisi ile sınır çizgisine kadar dolduruldu ve tarak çıkarıldı. Örnekler, 1µL boya (loading dye) (Vivantis, Malezya) ve 5µL PCR ürünü olacak şekilde parafilm üzerinde karıştırılarak jele yüklendi. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (Vivantis, Malezya) PCR ürünleriyle birlikte jele 5 µL yüklendi. Güç kaynağı (Thermo Scientific EC 300 XL, A.B.D) 120 volt, 60 amper, 30 dakika olacak şekilde ayarlandı. Süre sonunda jel Etidyum Bromür içeren çözeltide 15 dakika bekletildi ve UV transillüminatörde görüntülendi. Görüntülerde DNA olup olmadığına bakıldı ve bilgisayara kaydedildi.

3.2.4. Exosap

Görüntüleme sonucunda elde edilen PCR ürüleri, kirlilik ve dimer yapı oluşumunu engellemek amacıyla exosap çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu işlemde Ekzon 2, Ekzon 3 ve Ekzon 10'da her bir örnek için 2 µl ExoSAP-IT (GML) ve 5 µl PCR ürünü PCR tüpünde karıştırıldı. PCR işlemi Çizelge 3.2.'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Exosap PCR işlemi aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Süre
1	Enzim Aktivasyonu	37 °C	30 dakika
2	Enzim İnaktivasyonu	80 °C	15 dakika
3	Muhafaza	4 °C	∞

3.2.5. Döngü sekans reaksiyonu

Döngü sekans reaksiyonu, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher, Austin/A.B.D.) kit kullanılarak hazırlanan karışımlar ile yapılmıştır. Karışımlar hazırlanırken, ileri (forward) primer için Ekzon 2, Ekzon 3 ve Ekzon 10'da her bir örnek için PCR tüpüne 1 µl BigDye Terminator Mix, 3 µl Sequencing Buffer, 2 µl Sequence F Primer, 2 µl Distile su, 2 µl PCR ürünü eklenerek toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. Geri (reverse) primer için Ekzon 2, Ekzon 3 ve Ekzon 10'da her bir örnek için PCR tüpüne 1 µl BigDye Terminator Mix, 3 µl Sequencing Buffer, 2 µl Sequence R Primer, 2 µl Distile su, 2 µl PCR ürünü eklenerek toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR işlemi Çizelge 3. 3.'te gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Döngü sekans PCR işlemi aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Süre
1	Aktivasyon	96 °C	1 dakika
2	Sekans (25 döngü)	96 °C	10 saniye
		50 °C	5 saniye
		60 °C	4 dakika
3	Muhafaza	4 °C	∞

3.2.6. PCR ürünlerinin pürifikasyonu

Pürifikasyon için 1g Sephadex tartılarak 14 ml steril saf su ile falkon tüp içerisinde karıştırıldı. Karıştırma işlemi 15 dakika aralıkla 3 defa tekrarlandı ve karışımın kıvamının yerine gelmesi için +4°C'de bekletildi. Hazırlanan Sephadex'ten 700 µl alınarak kolona konuldu. Kolon 2000g'de 2 dakika santrifüj edilerek kolon içinde tabaka oluşması sağlandı. Kolon kısmı temiz eppendorf tüpe aktarıldı. PCR ürünleri tabakanın içine 10 µl olacak şekilde yerleştirildi ve 2000g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucunda kolondan süzülen kısımdan 20 µl alınarak plate yerleştirildi.

3.2.7. DNA dizi analizi

DNA Dizi Analizi için ABI 310 (Hitachi, Japon) gen sekans cihazı kullanıldı. Hazırlanan plate cihaza yerleştirildi. Sonuçlar SeqScape programı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.8. Total RNA eldesi

RNA izolasyonu için Macharey Nagel kit (NucleoSpin RNA Blood, Germany) kullanılmıştır. Kit prosedürüne göre çalışılmıştır.

Kan örneği karıştırıldıktan sonra 200 µl alınarak eppendorf tüpe konulup ve üzerine 200 µl DL çözültisi eklenerek karıştırıldı. Üzerine 5 µl proteinaz K çözültisi eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Karışım 2000g'de 10 saniye santrifüj edildi. Karışıma 200 µl %70'lik etanol eklenip karıştırıldı. Karışım 2000g'de 10 saniye santrifüj edildi. Karışım kolona transfer edilerek 11000g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmı temiz toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 350µl MDB çözültisi eklenerek 11000g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmı temiz toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 95 µl rDNase eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası karışıma 200µl RB2 çözültisi eklenerek karışım 11000g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmı temiz toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 600µl RB3 çözültisi eklenerek 11000g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmı temiz toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 250 µl RB3 çözültisi eklenerek karışım 11000g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmı temiz toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 60µl RNase free H₂O eklenerek 11000g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra RNA elde edildi.

3.2.9. Tek sarmal cDNA eldesi

Elde etmiş olduğumuz RNA'lerden cDNA elde etmek için ProtoScript First Strand cDNA Synthesis kit (New England Biolabs) kullanılmıştır. Kit prosedürü aşağıda açıklanmıştır.

PCR tüpü içerisine total RNA'dan 5µl, d(T)₂₃ VN (50 µM)'den 1µl, Nuclease-free H₂O'dan 1µl eklenerek karıştırıldı. Karışım PCR cihazında 5 dakika 65°C'de bekletilerek RNA denature edildi. Sonrasında cDNA sentezi için tüp içerisine ProtoScript II Reaction Mix (2X)'den 10µl ve ProtoScript II Enzyme Mix (10X)'den 2 µl eklenerek karıştırıldı. Karışım PCR cihazında 42°C'de 60 dakika, 80°C'de 5 dakika bekletilerek cDNA elde edilmiş oldu.

3.2.10. MEFV geninin gen ifade düzeyinin Real Time PCR (Eş Zamanlı PCR) yöntemi ile belirlenmesi

Elde ettiğimiz cDNA'ları NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, A.B.D) cihazında ölçerek miktarı ayarlanmıştır. cDNA ölçüm sonuçları bulgular kısmında verilmiştir. Çalışmada Promega kit kullanılmış olup Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR (A.B.D) sistem cihazında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Primerler NCBI veritabanının Gene arayüzü kullanılarak ilgili genlerin primerleri tasarlandı. Gen transkripsiyon düzeyleri, referans (house keeping) gen olarak GAPDH kullanılarak eş zamanlı (real time) PCR yöntemiyle belirlenip kıyaslanarak ekspresyon düzeyleri ortaya konulmuştur. Analizde kullanılan primerler,

GAPDH: Forward 5'GTTCGTCATGGGTGTGAACC3'

Reverse 5'GCATGGACT GTGGTCATGAGT3'

MEFV: Forward 5'TGCCTGTCCCTGAAAAGTGG3'

Reverse 5'AATCAGCTCCGGAACAATGAA C3'

baz dizilimine sahiptir.

Promega kit (A.B.D.) prosedürüne göre, Master Mix'ten 12,5 µl, RNAaz içermeyen sudan 5,5 µl, GAPDH Forward Primerden 1µl, GAPDH Reverse Primerden 1µl, cDNA'dan 5µl olacak şekilde toplamda 25µl karışım hazırlandı. Master Mix'ten 12,5 µl, RNAaz içermeyen sudan 5,5 µl, MEFV Forward Primerden 1µl, MEFV Reverse

Primerden 1µl, cDNA'dan 5µl olacak şekilde toplamda 25µl karışım hazırlandı. Real Time-PCR işlemi aşamaları Çizelge 3.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4.Real Time-PCR işlemi aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Süre
1	Enzim Aktivasyonu	95 °C	2 dakika
2	Aplifikasyon	95 °C	15 saniye
	(45 döngü)	60°C	1 dakika
3	Bekleme	60°C	∞

MEFV geninin ifade düzeyleri, Real Time PCR yöntemi ile döngü eşik değeri olan C_t (threshold cycle) değerleri olarak elde edilmiştir. MEFV geninin ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri Denklem 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri MEFV geni ile ilgili katsayı bilgisi vermekte ve MEFV geninin ifade düzeyinin kontrol ile gende meydana gelen mutasyonlar arasında kıyaslama yapılmasını sağlamaktadır.

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[\text{Örnek}\Delta C_t (\text{Gen} - \text{Referans}) - \text{Kontrol}\Delta C_t (\text{Gen-Referans})]}$$

Denklem 3.1. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri hesaplama formülü (Schmittgen ve Livak, 2008)

MEFV geninin ifade düzeyini, referans gen olarak kullandığımız GAPDH geni ile kıyaslamak amacıyla $2^{-\Delta C_t}$ değeri Denklem 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır. $2^{-\Delta C_t}$ değeri ile MEFV geninin ifade düzeyinin referans gene göre hangi oranda değiştiği belirlenmektedir.

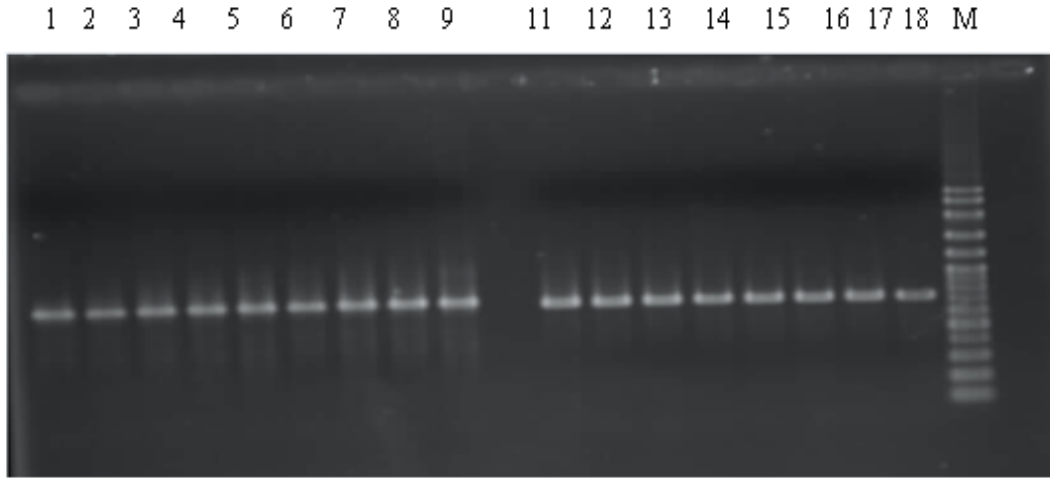
$$2^{-\Delta C_t} = 2^{-(\text{Gen}C_t - \text{Referans}C_t)}$$

Denklem 3.2. $2^{-\Delta C_t}$ değeri hesaplama formülü (Schmittgen ve Livak, 2008).

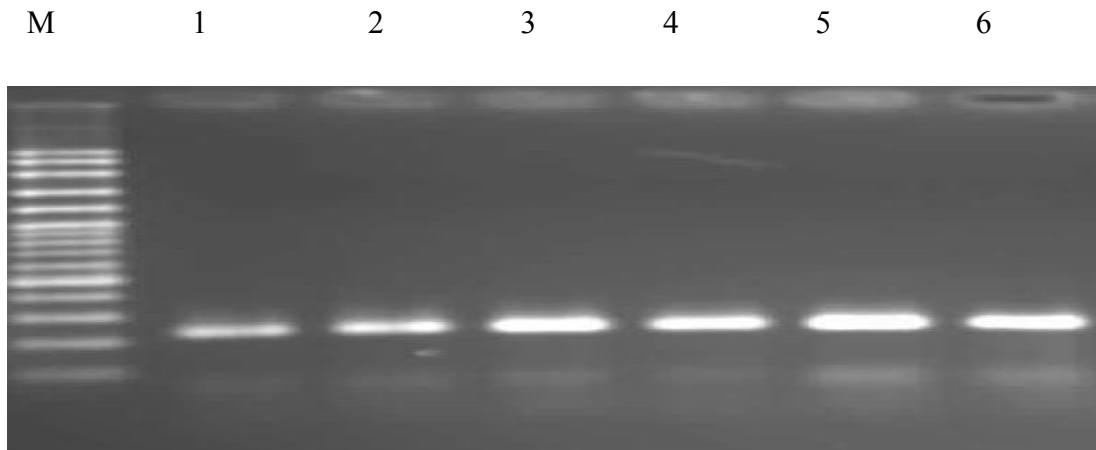
4. BULGULAR

4.1. MEFV Geninin PCR Amplifikasyonu Sonuçları

MEFV genine ait ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 10 bölgelerinin PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz agaroz jel elektroforez görüntüsü ekzon 2 ve ekzon 10 için Şekil 4.1.'de, ekzon 3 için Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz ekzon 2 ve ekzon 3 bölgesi için jel görüntüsü. Hastalara göre ekzon 2 için elde ettiğimiz bantlar 1-9 arasında, ekzon 10 için elde ettiğimiz bantlar 11-18 arasında gösterilmiştir. M markerdir.



Şekil 4.2. PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz ekzon 3 bölgesi için jel görüntüsü. 1-6 arasındaki bantlar hastalara aittir. M markerdir.

4.2. Amplifikasyonların DNA Dizi Analizi Sonuçları

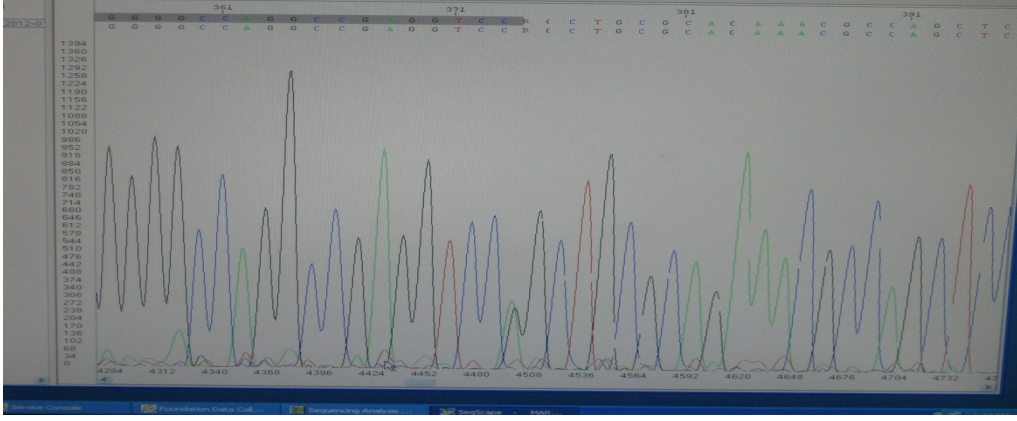
DNA dizi analizi sonucuna göre çalışmada 47 tane MEFV geninde mutasyon olan AAA hastası ile mutasyonu bulunmayan 8 birey (kontrol grubu) olmak üzere toplam 55 kişi çalışıldı. DNA dizi analizinden elde ettiğimiz sonuçlara göre olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı

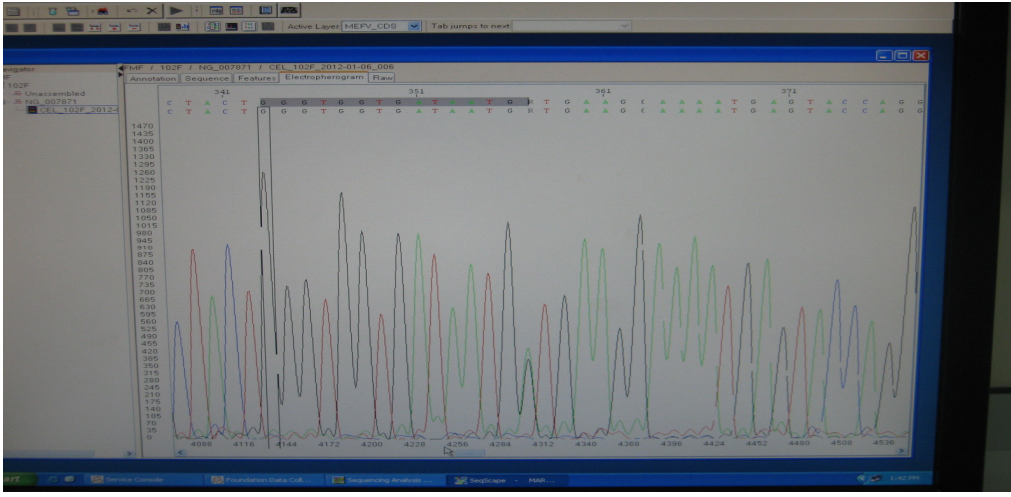
Mutasyon	Genotip	Hasta sayısı
Heterozigot	R202Q/0	4
	E148Q/0	3
	M680I/0	2
	R408Q/0	1
	V726A/0	1
Birleşik Heterozigot	R202Q/M694V	4
	R202Q/E148Q	3
	E148Q/M694I	2
	V726A/M680I	1
	E148Q/M694V	1
	E148Q/R408Q	1

Kompleks Heterozigot	R202Q/M694V/M680I	4
	R202Q/M694V/V726A	3
	R202Q/E148Q/M694V	2
	E148Q/M694I/V726A	1
	R202Q/E148Q/R408Q	1
	R202Q/P369S/R408Q	1
Homozigot	M680I/M680I	7
	R202Q/R202Q	1
	E148Q/E148Q	1
	M694V/M694V	1
Birleşik Homozigot	R202Q/R202Q+M694V/M694V	2
Normal Genotip		8
Mutasyonlu genotip		47
Toplam		55

DNA dizi analizi sonucunda bulduğumuz bazı mutasyonlardan ekzon 2 bölgesinde görülen R202Q heterozigot mutasyonuna ait görüntü Şekil 4.3.'te, ekzon 10 bölgesinde görülen M694V heterozigot mutasyonuna ait görüntü Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Ekzon 2 bölgesinde görülen R202Q heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü



Şekil 4.4. Ekzon 10 bölgesinde görülen M694V heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü

4.3. MEFV Geninin İfade Analizi Sonuçları

Ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 10 gen bölgelerinde tanımlanan genetik mutasyonların MEFV geni ifade düzeyinin belirlenmesi için Real Time PCR amplifikasyonları yapılmıştır. Real Time PCR amplifikasyonu sırasında SYBR Green I boyası tarafından meydana gelen floresan ışımaya cihaz tarafından kaydedilerek, örneklerin başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak vermiş olduğu C_t değerleri bulunmuştur. Real Time PCR analizinde kullandığımız cDNA'ların kalite ve miktarı NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, A.B.D.) spektrofotometre cihazında ölçüldü. Ölçmüş olduğumuz cDNA konsantrasyonlarında A260/A280 oranlarının 1,7-2,0 ng/ μ L arasında olması nedeniyle numunelerimizin cDNA'larını seyreltme yapmadan kullandık. MEFV genine ait cDNA konsantrasyonları ile C_t değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. MEFV genine ait cDNA konsantrasyonları ile C_t değerleri

Hasta No	cDNA Konsantrasyonu (ng/μL)	MEFV genine ait C _t değerleri
1	1122,6	25,9205
2	927,5	30,0844
3	965,6	33,8627
4	1003,4	26,8619
5	966,49	31,0087
6	933,4	30,6761
7	967,5	27,7390
8	933,5	31,1177
9	1024,3	31,3508
10	1054,5	30,9133
11	1015,1	25,5847
12	1043,2	29,9926
13	1036,2	30,8916
14	1025,1	32,4744
15	930,1	31,1654
16	960,7	32,5355
17	915,4	33,7519
18	962,4	33,5704
19	943,4	32,8527
20	1089,1	23,8470
21	1103,2	23,9147
22	1054,9	23,8583
23	1100,7	23,9767

24	1094,1	23,9854
25	1067,4	23,9680
26	1065	23,7956
27	1076	24,0105
28	1069	24,0664
29	1090,8	26,3839
30	1067,4	26,3122
31	1034,4	26,1074
32	945,6	31,5955
33	947,6	30,4683
34	928	32,9961
35	967,9	30,5223
36	931,4	31,4731
37	924,7	30,2322
38	938,3	28,4709
39	923	29,4790
40	1068	28,7522
41	927,7	24,6842
42	942,9	28,5784
43	933,2	30,9830
44	918,4	28,1558
45	927	28,9963
46	922,2	31,1670
47	922,3	29,1900
48 kontrol	991,7	29,9488
49 kontrol	953,7	22,1450

50 kontrol	956,1	29,6780
51 kontrol	950,6	29,6620
52 kontrol	926,7	30,8615
53 kontrol	1093,2	30,9230
54 kontrol	949,9	29,9537
55 kontrol	951,8	32,2556

Real Time PCR amplifikasyonu sonucunda MEFV geni için elde ettiğimiz C_t değerlerini ve referans gen olarak kullandığımız GAPDH geni için elde ettiğimiz C_t değerlerini ayrı ayrı hesaplayarak kıyaslama yapacağımız $2^{-\Delta C_t}$ değerlerini ve MEFV genine ait katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerini bulduk. Mutasyonlara göre, MEFV geni ve kıyaslama yaptığımız referans gen GAPDH'e ait olan $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ile MEFV genine ait katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Mutasyonlara göre MEFV geni ve kıyaslama yaptığımız referans gen GAPDH'e ait olan $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ile MEFV genine ait katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

HASTA NO	GÖRÜLEN MUTASYON	$2^{-\Delta C_t}$ değerleri MEFV geni için	$2^{-\Delta C_t}$ değerleri GAPDH (referans) geni için	MEFV geni $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri
1	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,939199	10,9102	0,0549757
2	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,052394	19,8642	0,0016844
3	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: V726A heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,003819	11,7697	0,0002073

4	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694I heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,489055	18,7264	0,0166801
5	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,027609	10,5758	0,0016672
6	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot, M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	0,034766	10,4353	0,0021277
7	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,266272	13,3855	0,0127039
8	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,025599	11,3719	0,0014376
9	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekson 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,021781	11,0089	0,0012634
10	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit	0,029495	10,3532	0,0018193

	edilmedi.			
11	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	1,185343	6,186	0,1223751
12	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve V726A heterozigot mutasyonları tespit edildi.	0,055836	6,351	0,0056157
13	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,029943	4,6107	0,0041476
14	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,009996	1,463	0,0043633
15	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694I heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,024767	0,8374	0,0188874
16	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi	0,009582	0,9824	0,0062287
17	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,004123	0,9919	0,0026551

18	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,004676	1,0024	0,0029793
19	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,00769	0,9945	0,0049384
20	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694I heterozigot, V726A heterozigot mutasyonları tespit edildi.	3,953095	20,7623	0,1215965
21	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve V726A heterozigot mutasyonları tespit edildi.	3,771709	19,6669	0,1224742
22	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve V726A heterozigot mutasyonları tespit edildi.	3,922142	21,0711	0,1188761
23	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	3,613229	20,5021	0,1125504
24	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu	3,591459	17,5683	0,1305548

	tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.			
25	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I homozigot mutasyonu tespit edildi.	3,634943	19,7379	0,1176062
26	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M680I heterozigot mutasyonu tespit edildi	4,09638	17,6696	0,1480524
27	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: V726A heterozigot, M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	3,529579	19,5812	0,1151179
28	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: H306N mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	3,395411	17,0052	0,1275099
29	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,681134	11,2886	0,0385340
30	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,715871	14,6822	0,0311362

31	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,825068	21,2796	0,0247612
32	Ekzon 2:R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0184	2,6836	0,0043744
33	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	0,0402	3,2355	0,0079253
34	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,00696	2,0181	0,0022032
35	Ekzon 2:R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0387	0,6756	0,0365593
36	Ekzon 2:R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0200	4,3935	0,0029085
37	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit	0,0473	2,3815	0,0126823

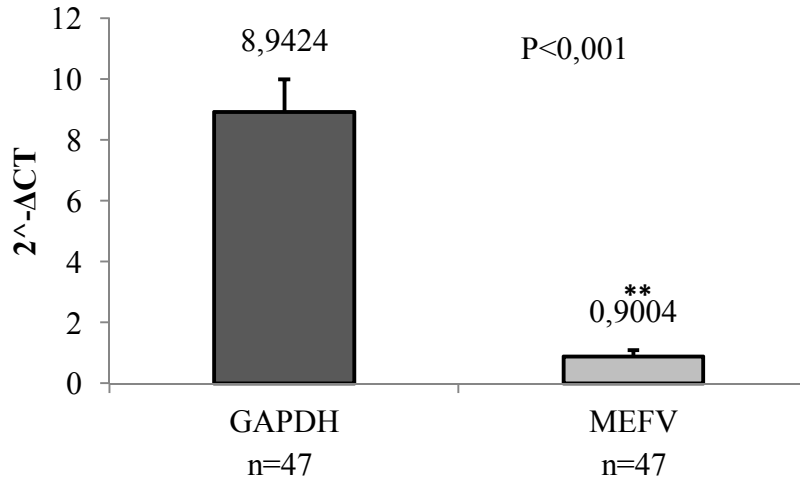
	edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.			
38	Ekzon 2:R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: P369S heterozigot ve R408Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,1604	0,2515	0,4071109
39	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0797	1,6443	0,0309597
40	Ekzon 2:R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,1319	2,57	0,0327798
41	Ekzon 2:Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: R408Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	2,2129	3,2716	0,4321191
42	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	0,14886	8,6296	0,0110131
43	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi.	0,02883	0,8475	0,0211774

	Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.			
44	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: R408Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,19957	1,3174	0,0966795
45	Ekzon 2: E148Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: R408Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,1114	7,9917	0,0089014
46	Ekzon 2: E148Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,02474	0,6796	0,0232476
47	Ekzon 2: R202Q heterozigot , E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,0974	5,0679	0,0122729
48 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0576	1,4328	0,0256569
49 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	12,862	9,9032	0,8293295

50 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0694	1,738	0,0255167
51 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0702	0,8956	0,0500699
52 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0306	11,466	0,0017028
53 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0293	2,0806	0,0089929
54 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,0574	1,931	0,0189707
55 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi	0,0116	4,3997	0,0016885

4.3.1. MEFV geninin referans gen GAPDH ile karşılaştırılması

Elde ettiğimiz sonuçlarda $2^{-\Delta Ct}$ formülüne göre MEFV genini, referans gen olan GAPDH ile kıyasladığımızda MEFV geninin ifade düzeyi düşük bulunmuştur. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması

Referans gen GAPDH ve MEFV genine ait verilerin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS paket programı versiyon 21 kullanılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Örnekler normal dağılım göstermediği için bu şartlar altında parametrik olmayan Mann-Whitney Testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı istatistikler Ortalama±Standart Hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Mann-Whitney testine göre $p<0,001$ bulunmuş olup, sonuçlar istatistik olarak anlamlıdır. Çizelge 4.4.'te Referans gen GAPDH ve MEFV genine ait istatistik analiz sonucu gösterilmiştir.

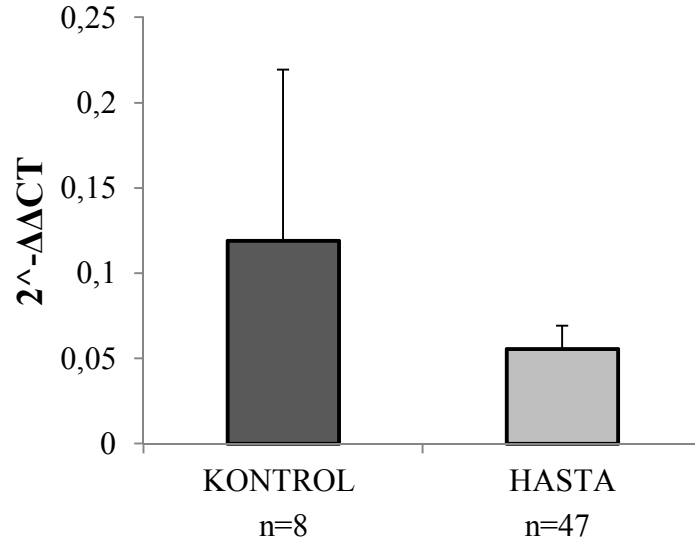
Çizelge 4.4. Referans gen GAPDH ve MEFV genine ait istatistik analiz sonuçları

Gen	n	Ort.±Std.Hata	p
GAPDH	47	8,9424±1,0761	<math><0,001</math>
MEFV	47	0,9004±0,2111	

4.3.2. MEFV geninde mutasyon olan hastaların gen ifadesinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması

Katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre MEFV geninde mutasyon bulunan 47 hasta ile mutasyonu bulunmayan 8 bireyin (kontrol grubu) gen ifade düzeylerini karşılaştırdığımızda MEFV geninde mutasyon bulunan hastaların gen ifade

düzeyi düşük bulunmuştur. MEFV geninde mutasyon olan hastaların gen ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. MEFV geninde mutasyon olan hastaların gen ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması

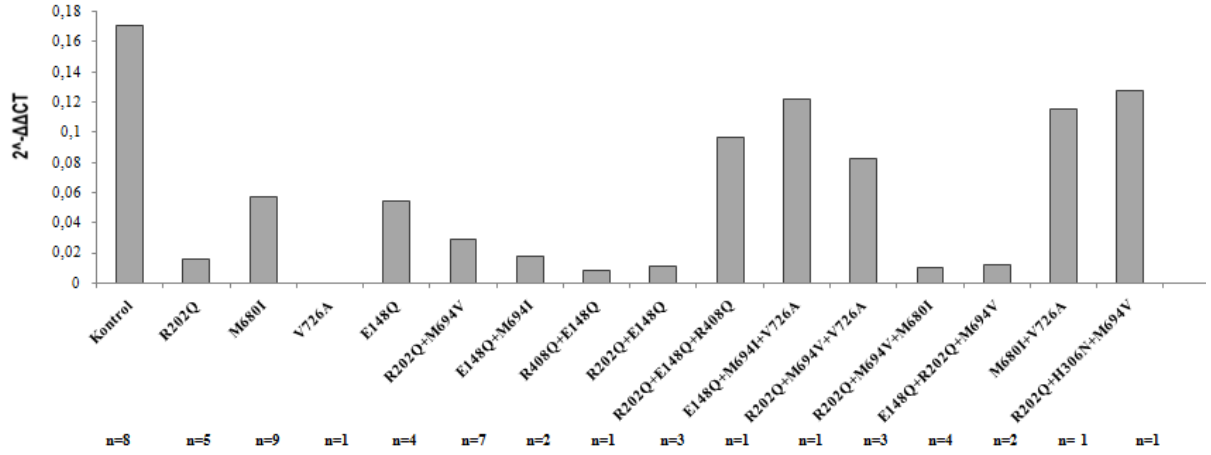
MEFV geninde mutasyon bulunan 47 hasta ile mutasyonu bulunmayan 8 bireyin (kontrol grubu) gen ifade düzeyi sonuçlarının istatistik olarak değerlendirilmesinde IBM SPSS paket programı versiyon 21 kullanılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Örnekler normal dağılım göstermediği için bu şartlar altında parametrik olmayan Mann-Whitney Testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı istatistikler Ortalama±Standart Hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Mann-Whitney Testine göre $p > 0,05$ bulunmuş olup, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MEFV geninde mutasyon bulunan hastalar ile mutasyonu bulunmayan kontrol grubuna ait istatistik analiz sonucu Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. MEFV geninde mutasyon bulunan hastalar ile mutasyonu bulunmayan bireylere ait istatistik analiz sonucu

	n	Ort.±Std.Hata	p
Kontrol	8	0,1191±0,1003	0,962
Hasta	47	0,0557±0,0133	

4.3.3. MEFV geninde görülen mutasyon çeşitlerinin ifade düzeylerinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması

MEFV geninde görülen mutasyonların ifade düzeylerini mutasyonu bulunmayan kontrol grubu karşılaştırdığımızda, R202Q mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, M680I mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, V726A mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, E148Q mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R202Q/M694V mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, E148Q/M694I mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R408Q/E148Q mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R202Q/E148Q mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R202Q/E148Q/R408Q mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, E148Q/M694I/V726A mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R202Q/M694V/M680I ifade düzeyinin düşük olduğu, E148Q/R202Q/M694V mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, M680I/V726A mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu, R202Q/P369S/R408Q mutasyonunun ifade düzeyinin yüksek olduğu ve R202Q/H306N/M694V mutasyonunun ifade düzeyinin düşük olduğu bulunmuştur. MEFV geninde görülen mutasyonlara göre genin ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

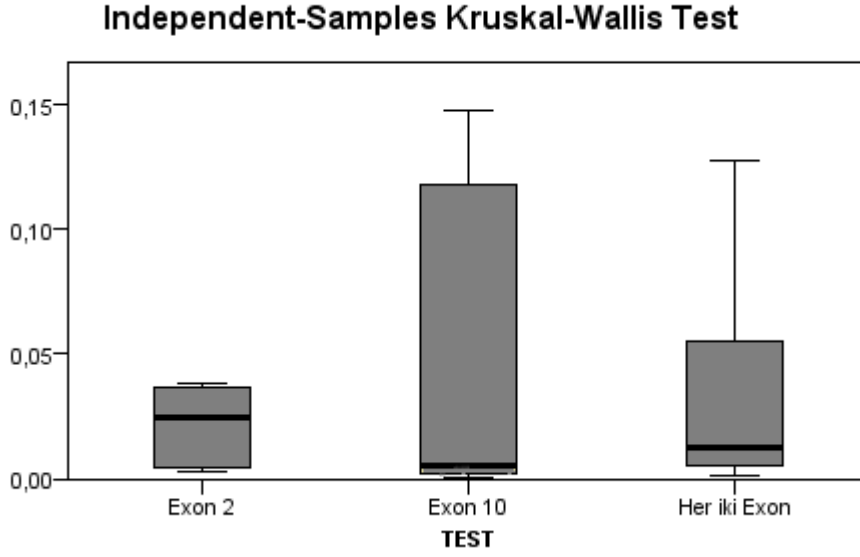


Şekil 4.7. MEFV geninde görülen mutasyonlara göre genin ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması

Bulduğumuz sonuçlar ile istatistiksel olarak ekzonlar arasında kıyaslama yaptığımızda Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk test sonuçlarına göre örnekler normal dağılım göstermediği için bu şartlar altında tek yönlü varyans analizinin parametrik olmayan alternatifi olan Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler Ortalama±Standart Hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Verilerin değerlendirmesinde IBM SPSS paket programı versiyon 21 kullanılmıştır. Sonuç olarak $p > 0,05$ olduğu için sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Çizelge 4.6. ve Şekil 4.8’de Ekzonlar arası istatistik analiz sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Ekzonlar arası istatistik analiz sonuçları

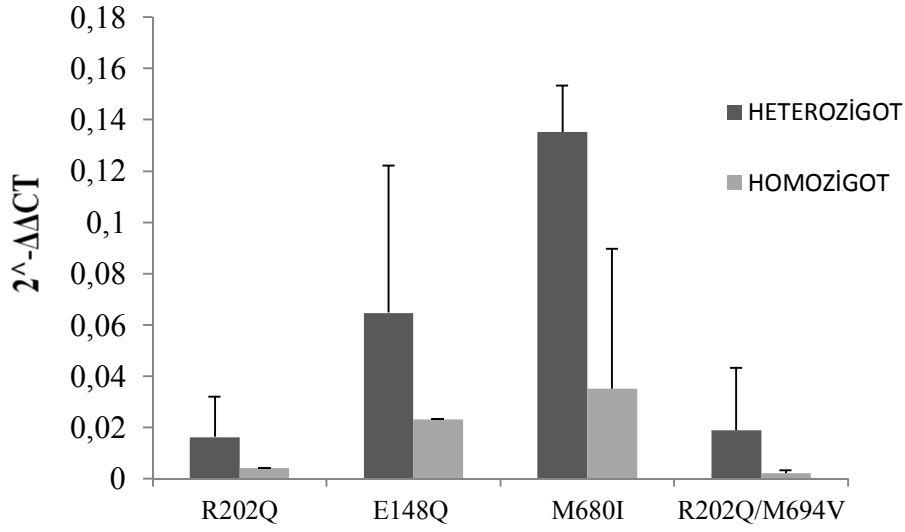
Ekzon	n	Ort.±Std.Hata	p
Ekzon 2	9	0,0331± 0,01	
Ekzon 10	10	0,0516± 0,02	0,66
Her 2 ekzon	25	0,0374± 0,09	



Şekil 4.8. Ekzonlar arası istatistik analiz sonuçları

4.3.4. MEFV geninde bulunan heterozigot ve homozigot mutasyonların gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

MEFV geninde görülen heterozigot ve homozigot mutasyonları karşılaştırdığımızda R202Q homozigot mutasyonunun ifade düzeyinin R202Q heterozigot mutasyonundan düşük olduğu, E148Q homozigot mutasyonunun ifade düzeyinin E148Q heterozigot mutasyonundan düşük olduğu, M680I homozigot mutasyonunun ifade düzeyinin M680I heterozigot mutasyonundan düşük olduğu, R202Q/M694V homozigot mutasyonunun R202Q/M694V heterozigot mutasyonundan düşük olduğu tespit edilmiştir. MEFV geninde görülen heterozigot ve homozigot mutasyonların ifade düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. MEFV geninde görülen heterozigot ve homozigot mutasyonların gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

4.3.5. MEFV geninde mutasyon olan hastaların klinik belirtileri ile gen ifadesi arasındaki ilişki

MEFV geninde mutasyon olan 47 hastayı, klinik belirtiler açısından incelediğimizde en sık görülen belirtiler karın ağrısı, ateş ve artirit olarak bulunmuştur. Nadir olarak göğüs ağrısı görülmüştür. Hastalara ait fenotipik özellikler Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Hastalara ait fenotipik özellikler

Hasta Sayısı	47
Kadın/Erkek	24/23
Karın ağrısı	% 63,83
Ateş	% 48,94
Artirit	% 42,55
Göğüs ağrısı	% 6,38
Apendektomi	% 8,51
Aile öyküsü	% 29,77
Kolşisin kullanımı	% 74,47

MEFV geninde mutasyon olan 47 hastayı genotip açısından incelediğimizde heterozigot mutasyon olarak R202Q, E148Q mutasyonlarının; birleşik heterozigot olarak R202Q/M694V, R202Q/E148Q mutasyonlarının; kompleks heterozigot mutasyon olarak R202Q/M694V/M680I, R202Q/M694V/V726A mutasyonlarının; homozigot mutasyon olarak M680I/M680I, birleşik homozigot olarak R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun sık görüldüğü bulunmuştur.

Hastalığa ait klinik belirtilerin sık görüldüğü homozigot mutasyonlarda genin ifade düzeyi hafif klinik belirtiler görülen heterozigot mutasyonlara göre daha düşük bulunmuştur. Klinik belirtilerin şiddetli görüldüğü M694V mutasyonu ile birlikte görülen R202Q mutasyonlarında genin ifade düzeyinin düşük olduğu tespit edilmiştir. R202Q mutasyonunun birlikte görüldüğü diğer mutasyonlarda genin ifade düzeyinin düşük olduğu görülmüştür. Klinik belirtilerin şiddetli olarak görüldüğü diğer bir mutasyon olan M680I mutasyonunda da genin ifade düzeyi düşük olarak tespit edilmiştir. Klinik açıdan hafif belirtilerin görüldüğü E148Q mutasyonunda genin ifadesi diğerlerine göre yüksek bulunmuştur. Klinik belirtilerin hafif olarak görüldüğü ekzon 3 mutasyonlarında da genin ifadesi diğer mutasyonlara göre yüksek olarak tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi, ülkemizde oldukça sık görülen bir hastalıktır. Hastalıkta görülen mutasyonların klinikte ne şekilde belirti verdiği (genotip-fenotip ilişkisi) araştırılmakta ve görülen mutasyon tipine göre hastalara yönelik tedavi yaklaşımında bulunmaktadır. Hastalıkla ilgili mutasyonların gen ifadesi ile ilgili yapılmış olan çalışma sayısı az olup, hastalığın genotipi ile gen ifadesi arasında bir ilişki bulunmaktadır (Notarnicola ve ark., 2002). Mutasyonu bulunmayan normal gen ile mutasyona uğramış genin ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile hastalığa ait patogenezin daha iyi anlaşılması mümkün olabileceği gibi mutasyonlu genin ifade düzeyindeki değişimlerin belirlenebilmesi ile farklı yaklaşımlarda bulunulması mümkün olabilecektir. Yapılmış olan çalışmaların çoğunda, strip assay ve PCR-RFLP ile belirli mutasyonların tanımlanması gibi yöntemler kullanıldığı için sadece belirli mutasyonlar tespit edilmiş ve gen ifade düzeyleri çalışılabilmiştir. Bu çalışmada ise diğer çalışmalardan farklı olarak DNA dizi analizi yöntemini kullanmamız bakımından belli mutasyonlar dışında kalan diğer mutasyonlara ait gen ifade düzeyleri de incelendi. Tartışmada, mutasyonlar ile gen ifade düzeyi arasındaki ilişki ve gen ifade düzeyleri ile klinik belirtilerin ilişkilendirilmesi üzerinde duruldu.

Notarnicola ve ark. (2002), yapmış oldukları çalışmada AAA hastalığına ait semptomları bulunan ve geninde mutasyon olan hastaların MEFV geni mRNA ifade düzeylerini sağlıklı kontrol grubundan düşük olarak tespit edilmiştir. AAA hastalığında, genotip ile fenotip arasında ilişki bulunduğunu, genotip ile MEFV mRNA ifade düzeyi arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Mutasyon sayısındaki artışa ve mutasyon tipine bağlı olarak MEFV mRNA ifade düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir. Hastalıkta klinik belirtilerin şiddetli görüldüğü M694V mutasyonunda MEFV mRNA ifade düzeyi diğer mutasyonlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu, klinik belirtilerin daha hafif görüldüğü ya da görülmediği E148Q mutasyonunda ise MEFV mRNA ifade düzeyinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. MEFV geni mRNA ifade düzeyi ile klinik belirtiler arasında ters bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (Notarnicola ve ark., 2002).

Üstek ve ark., (2007), MEFV geninde bulunan 5 mutasyonu (M694V, M680I, V726A, M694I ve E148Q) PCR-RFLP yöntemi ile tanımlamışlar ve MEFV geni ifade düzeyini incelemişlerdir. Hastalarda MEFV geni mRNA ifade düzeyi akut atak süresince asemptomatik periyotla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Akut inflamasyona bağlı olarak MEFV geni mRNA ifade düzeyinin azalabileceği öne sürülmüştür. M694V

mutasyonu ile diğer mutasyonları karşılaştırdıklarında MEFV geni mRNA ifade düzeyinde önemli bir fark bulamamışlardır (Üstek ve ark., 2007).

Kocadağ Kocazorbaz, (2008), tarafından yapılan çalışmada ise M694V homozigot mutasyonu bulunan hastalarda MEFV geni mRNA ifade düzeyinin sağlıklı kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. M694V homozigot mutasyonunun mRNA ifade düzeyinin, E148Q heterozigot ve M694V heterozigot mutasyonu bulunan hastalardan daha düşük olduğunu tespit etmiştir.

Kireçtepe ve ark., (2011), çocuk hastalar ile yapmış oldukları çalışmada MEFV geninde bulunan 5 mutasyonu (M694V, M680I, V726A, M694I ve E148Q) PCR-RFLP yöntemi ile tanımlamışlar ve MEFV geni ifade düzeyini incelemişlerdir. MEFV geninde mutasyon bulunan hastalarda MEFV geni ifade düzeyi sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında anlamlı oranda azalma olduğunu görmüşlerdir.

Bir diğer çalışmada ise, MEFV geninde mutasyon bulunan hastalarda MEFV geni mRNA ifade düzeyi sağlıklı kontrol grubundan düşük bulunmuştur (Tozkır ve ark., 2014).

Çalışmamızda DNA dizi analizi ile mutasyonları tespit etmemiz bakımından diğer çalışmalardan farklı olarak daha çok sayıda mutasyona ait MEFV geni ifade düzeyini inceledik. Diğer çalışmalarda MEFV geninde sık görülen M694V mutasyonunun gen ifade düzeyi incelenmiştir. Bizim çalışmamızda ise M694V mutasyonunun R202Q ile birlikte bulunduğu mutasyon sayısının fazla olması dikkat çekmektedir. Bu durumun nedeni, R202Q mutasyonunun M694V ile cis konumunda bulunması ve birlikte kalıtılmasından kaynaklanmaktadır (Infevers, 2018). Diğer çalışmalarda çalışma yöntemi bakımından sadece belli mutasyonlar incelenebilmiş ve R202Q mutasyonundan bahsedilmemiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak, DNA dizi analizi sonuçlarına göre birleşik heterozigot ve kompleks heterozigot mutasyon sayısı da tarafımızdan fazla bulunmuştur.

Çalışmamızda referans gen GAPDH ile mutasyona sahip olgulardaki MEFV genini karşılaştırdığımızda MEFV geninin ifade düzeyi düşük bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile uyumlu olarak MEFV geninde mutasyon bulunan hastaların MEFV geni ifade düzeyi, mutasyonu bulunmayan kontrol grubundan düşük olduğu, homozigot mutasyonların MEFV geni ifade düzeyinin ise heterozigot mutasyonlardan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da bize homozigot olgularda genin etkileniminin daha fazla olduğunu göstermektedir. Mutasyon çeşitlerine göre genin ifade düzeyini incelediğimizde mutasyonu

bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda M680I mutasyonu ve E148Q mutasyonunda genin ifadesi azalmış olup, R202Q mutasyonu ve V726A mutasyonunda ise genin ifadesinin daha düşük olduğu görülmüştür. Birleşik heterozigot genotiplerde, E148Q/M694I, R202Q/M694V, R202Q/E148Q mutasyonlarında mutasyonu bulunmayan kontrol grubuna göre genin ifadesindeki azalma fazla iken, M680I/V726A mutasyonunda gen ifadesinin yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Ekzon 3 mutasyonları ile birlikte görülen R202Q/E148Q/R408Q, R202Q/P369S/R408Q, R202Q/H306N/M694V kompleks mutasyonlarında MEFV geninin ifadesi yüksek olup, kompleks heterozigot genotiplerde, E148Q/M694I/V726A ve R202Q/M694V/V726A mutasyonlarında genin ifadesi mutasyonu bulunmayan kontrol grubundan biraz düşük bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak mutasyon çeşitlerine göre genin ifadesinde görülen değişikliklere ekzonların gendeki yerleşim yerlerinin farklılığından dolayı olması muhtemeldir. Örneğin ekzon 10'un gendeki yerleşim yeri olarak 3' ucuna yakın olması nedeniyle nükleaz aktivitesine daha hassastır.

MEFV geninde mutasyon bulunan hastaları fenotip yönünden incelediğimizde karın ağrısı (%63,18), ateş (%48,94) ve artirit (%42,55) en sık görülen belirtilerdir. Klinik belirtilerin şiddetli olarak görüldüğü M694V/R202Q homozigot mutasyonunda genin ifade düzeyinin düşük olduğu görülmüştür. Amiloidoz ve apendektomi gibi ciddi klinik belirtilerin görüldüğü M680I homozigot mutasyonunda genin ifadesinde önemli azalma olduğu, klinik belirtilerin daha hafif görüldüğü E148Q homozigot mutasyonunda ise genin ifade düzeyinin diğer mutasyonlara göre biraz daha yüksek olduğu izlenmiştir. Klinik açıdan belirtilerin hafif olarak görüldüğü taşıyıcı bireylerde MEFV geninin ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubundan düşük olması, gende meydana gelen moleküler hasarın semptomları açıklamada muhtemelen katkısının olduğunu düşündürmektedir. Fenotipik özelliklerin belirgin olarak görüldüğü kompleks R202Q/M694V/M680I ve E148Q/R202Q/M694V mutasyonlarında ise genin ifadesi mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Klinik açıdan meydana gelen inflamasyonlardan pyrin protein sorumlu olup, bu protein gende görülen mutasyonlar sonucunda görevini yerine getirememektedir. Bu nedenle MEFV geninin transkriptinde görülen farklılaşma neticesinde genin ifadesinde azalma meydana geldiği düşünülmektedir. MEFV geninin ifade düzeyi ile fenotipin incelendiği çalışma sayısının kısıtlı olmasından dolayı çalışma verilerimizi ancak Notarnicola ve ark., (2002) ile Kireçtepe ve ark., (2011) yapmış oldukları çalışmalarla kıyaslayabilme fırsatı bulabildik, karşılaştırmada sonuçların

bu çalışmalar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla muhtemel klinik belirtilerin gen ifade düzeyleri ile ilişkilendirilebileceği ve farklı mutasyon tiplerinde, kombine ve kompleks mutasyonların birlikteliğinde, heterozigot ve homozigot olgularda, ayrıca aynı mutasyona sahip farklı olguların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ile elde edilecek bilgilerle konuya daha açıklayıcı yönde yaklaşımda bulunulması sağlanabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MEFV geni mRNA ifade düzeyinde görülen değişiklikler, mutasyon tipi ve mutasyonların gendeki konumu ile bağlantılıdır. Örneğin M694V mutasyonu gende 3' ucuna daha yakın bulunmakta ve nükleazlara daha duyarlı olmaktadır. Mutasyonlar sonucunda DNA molekülünün üç boyutlu yapısında meydana gelen değişiklikler sonucunda transkripsiyon faktörlerine erişimde hasar meydana gelmiş olabilir. Mutasyonlar mesajların işlenmesini değiştirebilir. MEFV geninin ifadesinin sürdürülebilmesini pirin protein pozitif oregülasyon yoluyla kontrol etmektedir. Mutasyonlarda olduğu gibi pirin proteinin bu fonksiyonu hasar görürse pozitif oregülasyon yolu fonksiyonunu tam olarak yerine getiremez ve sonuç olarak MEFV geni mRNA ifade düzeyinin düşük olmasına sebep olmaktadır. MEFV transkripsiyon yolunun AAA hastalarında yanlış düzenlenmesi sonucunda hastalığın patofizyolojisi MEFV geni mRNA ifade düzeyinde bozukluğa sebep olmuştur.

Sonuç olarak homozigot ve heterozigot olgulardaki gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, homozigot ve kompleks heterozigot mutasyon taşıyan olguların ekspresyon düzeylerinde heterozigot ve mutasyonu bulunmayan olgulara göre anlamlı oranda azalmanın olduğu özellikle M694V olgularının R202Q mutasyonu ile birlikteliğinde ise ekspresyon düzeyinde belirgin azalmanın olduğu görülmüştür. Klinik açıdan şiddetli belirtilerin görüldüğü mutasyonlarda genin ifadesinin düşük olması bize fenotip ile gen ifadesi arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgilerin daha ileride yapılması düşünülen çalışmaların planlanmasında önemli katkıları olacağı ve bu konuda yapılacak çalışmaların genişletilerek sürdürülmesi ile hastalığa yaklaşımda önemli bilgiler ortaya koyacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, E. 2003. Nuclear Factor- κ B and Its Role in Sepsis-Associated Organ Failure. *The Journal Infectious Diseases*, 187 (2) : 364-9.
- Adwan, M.H. 2015. A brief history of familial Mediterranean fever. *Saudi Med. J.*, 36 (9) : 1126-1127.
- Akar, N., Mısıroğlu, M., Yalçinkaya, F., Akar, E., Çakar, N., Tümer, N., Akçakuş, M., Taştan, H., Matzner, Y. 1999. MEFV Mutations in Turkish Patients Suffering from Familial Mediterranean Fever. *Hum Mutat*, 15 (1) : 118-9.
- Aksu, K., Keser, G. 2011. Coexistence of vasculitides with Familial Mediterranean Fever. *Rheumatol Int.*, 31 : 1263-1274.
- Alghamdi, M. 2017. Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clin Rheumatol* 36 : 1707-1713.
- Altug, U., Ensarı, C., Sayın, D.B., Ensarı, A. 2013. MEFV gene mutations in Henoch-Schönlein purpura. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 16 : 347-351.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R.H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2) : 209-219.
- Bakkaloğlu, A. 2003. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol*, 18: 853-859.
- Balcı, B., Tınaztepe, K., Yılmaz, E., Güçer, Ş., Özen, S., Topaloğlu, R., Beşbaş, N., Özgüç, M., Bakkaloğlu, A. 2002. MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever phenotype II patients with renal amyloidosis in childhood: a retrospective clinicopathological and molecular study. *Nephrol Dial Transplant*, 17 : 1921–1923.
- Balkarlı, A., Akyol, M., Tepeli, E., Elmas, L., Cobankara, V. 2016. MEFV gene variation R202Q is associated with metabolic syndrome. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20 : 3255-3261.
- Balow, J.E., Jr., Shelton, D.A., Orsborn, A., Mangelsdorf, M., Aksentijevich, I., Blake, T., Sood, R., Gardner, D., Liu, R., Pras, E., Levy, E.N., Centola, M., Deng, Z., Zaks, N., Wood, G., Chen, X., Richards, N., Shohat, M., Livneh, A., Pras, M., Dogget, N.A., Collins, F.S., Liu, P.P., Rotter, J.I., Fischel-Ghodsian, N., Gumucio, D., Richards, R.I., Kastner, D.L. 1997. A High-Resolution Genetic Map of the Familial Mediterranean Fever Candidate Region Allows Identification of Haplotype-Sharing among Ethnic Groups. *Genomics*, 44 : 280-291.
- Baykal, Y., Sağlam, K., Yılmaz, M.I., Taşlıpınar, A., Akıncı, S.B., Inal, A. 2003. Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF- α level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol*, 22 : 99-101.

- Beheshtian, M., Izadi, N., Kriegshauser, G., Kahrizi, K., Mehr, E.P., Rostami, M., Hosseini, M., Azad, M., Montajabiniat, M., Kariminejad, A., Nemeth, S., Oberkanins, C., Najmabadi, H. 2016. Prevalence of common *MEFV* mutations and carrier frequencies in a large cohort of Iranian populations. *Journal of Genetics*, 95 (3) : 667-674.
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. 1998. Colchicine: 1998 Update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 28 (1) : 48-59.
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. 1998. Familial Mediterranean Fever. *Lancet*, 351 : 659-64.
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. 2003. Reproductive system in familial Mediterranean fever: an overview. *Ann Rheum Dis*, 62 : 916-919.
- Ben-Chetrit, E., Toubit, I. 2009. Familial Mediterranean Fever in the World. *Arthritis & Rheumatism*, 61 : 1447-1453.
- Ben-Chetrit, E., Urieli-Shoval, S., Calko, S., D. Abeliovich, D., Matzner, Y. 2002. Molecular diagnosis of FMF: Lessons from a study of 446 unrelated individuals. *Clin Exp Rheumatol*, 20 (26) : 25-29.
- Birmingham, N., Luetlich, K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 9 : 159-164.
- Bernot, A., Da Silva, C., Petit, J. L., Cruaud, C., Caloustian, C., Castet, V., Ahmed-Arab, M., Dross, C., Dupont, M., Cattani, D., Smaoui, N., Dode, C., Pecheux, C., Nedelec, B., Medaxian, J., Rozenbaum, M., Rosner, I., Delpech, M., Grateau, G., Demaille, J., Weissenbach, J., Toubit, I. 1998. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Human Molecular Genetics*, 7 (8) : 1317-1325.
- Bhat, A., Naguwa, S.M., Gershwin, M.E. 2007. Genetics and New Treatment Modalities for Familial Mediterranean Fever. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1110 : 201-208.
- Booth, C.S., Pienaar, E., Termaat, J.R., Whitney, S.E., Louw, T.M., Viljoen, H.J. 2010. Efficiency of the polymerase chain reaction. *Chemical Engineering Science*, 65 : 4996-5006.
- Cakar, N., Yalçinkaya, F., Ozkaya, N., Tekin, M., Akar, N., Koçak, H., Misirlioğlu, M., Akar, E., Tümer, N. 2001. Familial Mediterranean Fever (FMF)-associated amyloidosis in childhood. Clinical features, course and outcome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 19 (24) : 63-67.
- Cazeneuve, C., Ajrapetyan, H., Papin, S., Roudot-Thoraval, F., Geneviève, D., Mndjoyan, E., Papazian, M., Sarkisian, A., Babloyan, B.B., Duquesnoy, P., Kouyoumdjian, J-C., Girodon-Boulandet, E., Grateau, G., Sarkisian, T., Amselem, S. 2000. Identification of *MEFV*-Independent Modifying Genetic Factors for Familial Mediterranean Fever. *American Journal Hum., Genet.*, 67 : 1136-1143.

- Cazeneuve, C., Sarkisian, T., Pêcheux, C., Dervichian, M., Ne'delec, B., Reinert, P., Ayvazyan, A., Kouyoumdjian, J., Ajrapetyan, H., Delpech, M., Goossens, M., Dode', C., Gâteau, G., Amselem, S. 1999. MEFV-Gene Analysis in Armenian Patients with Familial Mediterranean Fever: Diagnostic Value and Unfavorable Renal Prognosis of the M694V Homozygous Genotype—Genetic and Therapeutic Implications. *Am. J. Hum. Genet.*, 65 : 88–97.
- Centola, M., Aksentijevich, I., Kastner, L. 1998. The hereditary periodic fever syndromes:moleculer analysis of a new family of inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics*, 7 (10) : 1581-1588.
- Centola, M., Wood, G., Frucht, D. M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D. W., Horwitz, M. E., Mansfield, E., Holland, S. M., O'Shea, J. J., Rosenberg, H. F., Malech H.L., Kastner, D.L. 2000. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95 (10) : 3223-31.
- Cerquaglia, C., Diaco, M., Nucera, G., La Regina, M., Montalto M., Mana, R. 2005. Pharmacological and Clinical Basis of Treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with Colchicine or Analogues: An Update. *Current Drug Targets–Inflammation & Allergy*, 4 : 117-124.
- Chae, J. J., Aksentijevich, I., Kastner, D. L. 2009. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*, 146 (5) : 467-478.
- Çobankara, V., Balkarlı, A. Ailesel Akdeniz Ateşi. 2011. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 4 (2) : 86-98.
- Dodé, C., Pêcheux, C., Cazeneuve, C., Cattan, D., Dervichian, M., Goossens, Delpech, M., Amselem, S., Gâteau G. 2000. Mutations in the MEFV Gene in a Large Series of Patients With a Clinical Diagnosis of Familial Mediterranean Fever. *American Journal of Medical Genetics*, 92 : 241–246.
- Dogan, C.S., Akman, S., Koyun, M., Bilgen, T., Comak, E., Gökceoglu Uslu, A. 2013. Prevalence and significance of the MEFV gene mutations in childhood Henoch-Schönlein purpura without FMF symptoms. *Rheumatol Int.*, 33 : 377-380.
- Duşunsel, R., Dursun, I., Gündüz, Z., Poyrazoğlu, M.H., Gürgöze, M.K., Dundar, M. 2008. Genotype-phenotype correlation in children with familial Mediterranean fever in a Turkish population. *Pediatrics International*, 50 : 208-212.
- Elgin, U., Berker, N., Demiryurek, D., Ilhan, B., Batman, A., Simsek, T. 2006. Multiple Conjunctival Lesions in a Patient with Polyarteritis Nodosa and Familial Mediterranean Fever. *Asian J Ophthalmol.*, 8 : 161-3.
- El-Shanti, H., Abdel Majeed, H., El-Khateeb, M. 2006. Familial Mediterranean fever in Arabs. *Lancet*, 367 : 1016-24.
- Erken, E., Erken, E. 2018. Cardiac disease in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*, 38 : 51-58.

- Eroglu, F.K., Beşbaş, N., Topaloglu, R., Ozen, S. 2015. Treatment of colchicine-resistant Familial Mediterranean fever in children and adolescents. *Rheumatol Int.*, 35 (10) : 1733-7.
- Farivar, S., Shiari, R., Hadi, E. 2010. Molecular analysis of MEFV gene in Iranian children with Familial Mediterranean fever. *Indian Journal of Rheumatology*, 25 : 66-68.
- Feld, O., Yahalom, G., Livneh, A. 2012. Neurologic and other systemic manifestations in FMF: Published and own experience. *Best Practice&Research Clinical Rheumatology*, 26 : 119-133.
- Fonnesu, C., Cerquaglia, C., Giovinale, M., Curigliano, V., Verrecchia, E., deSocio, G., La Regina, M., Gasbarrini, G., Manna, R. 2009. Familial Mediterranean Fever: A review for clinical management. *Joint Bone Spin*, 76 : 227-233.
- Grandemange, S., Aksentijevich, I., Jeru, I., Gül, A., Touitou, I. 2011. The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes and Immunity*, 12 : 497-503.
- Günel, S. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real- Time PCR". *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27 : 763-767.
- Infervers. 2018. <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/search.php?n=1>
- Ishmael, F.T., Stellato, C. 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101 : 437-443.
- Joshi, M., Deshpande, J.D. 2011. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1) : 81-97.
- Kaltenboeck, B., Wang, C. 2005. Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. *Advances In Clinical Chemistry*, 40 : 219-249.
- Kocazorbaz Kocadağ, E. 2008. Ailesel Akdeniz Ateşli Hastalarda MEFV Gen Mutasyonlarının mRNA Ekspresyonu İle İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir. 81s.
- La Regina, M., Ben-Chetrit, E., Gasparyan, A.Y., Livneh, A., Ozdogan, H., Manna, R. 2013. Current trends in colchicine treatment in familial Mediterranean fever (FMF). *Clin Exp Rheumatol*, 31 (77) : 41-46.
- Leung, Y.Y., Li Yao Hui, L., Kraus, V.B. 2015. Colchicine-update on mechanism of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum.*, 45 (3) :341-350.
- Lidar, M., Livneh, A. 2007. Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *The journal of medicine*, 65 (9) : 318-324.
- Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., Pras, M. 1997. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis&Rheumatism*, 40 (10) : 1879-1885.

- Livneh, A., Langevitz, P. 2000. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 14 (3) : 477-498.
- Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Padeh, S., Migdal, A., Sohar, E., Pras, M. 1996. The Changing Face of Familial Mediterranean Fever. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 26 (3) : 612-627.
- Manna, R., Cerquaglia, C., Curigliano, V., Fonnesu, C., Giovinale, M., Verrecchia, E., Montalto, M., DeSocio, G., Soriano, A., LaRegina, M., Gasbarrini, G. 2009. Clinical features of familial Mediterranean fever: an Italian overview. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 13 (1) : 51-53.
- Marek-Yagel, D., Berkun, Y., Padeh, S., Abu, A., Reznik-Wolf, H., Livneh, A., Pras, M., Pras, E. 2009. Clinical Disease Among Patients Heterozygous for Familial Mediterranean Fever. *Arthritis&Rheumatism*, 60 (6) : 1862-1866.
- Marzouk, H., Lotfy, H.M., Farag, Y., Rashed, L.A., El-Garf, K. 2015. Mean Platelet Volume and Splenomegaly as Useful Marker of Subclinical Activity in Egyptian Children with Familial Mediterranean Fever: A Cross-Sectional Study. *International Journal of Chronic Diseases*, 2015 : 1-6.
- Matzner, Y., Abedat, S., Shapiro, E., Eisenberg, S., Bar-Gil-Shitrit, A., Stepensky, P., Calco, S., Azar, Y., Urieli-Shoval, S. 2000. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood*, 96 (2) : 727-731.
- Matzner, Y. 1995. Biologic and clinical advances in familial Mediterranean fever. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 18 : 197-205.
- Metzker, M.L. 2005. Emerging Technologies in DNA sequencing. *Genome Res.*, 15 : 1767-1776.
- Mirmajlessi, S.M., Loit, E., Mänd, M. 2016. General Principles of Real-Time PCR: A Technology for Quantitative Detection of Phytophagogens. *Journal of Medical and Bioengineering*, 5 (1) : 49-52.
- Munshi, A. 2012. DNA Sequencing methods and applications. ISBN: 978-953-51-0564-0, India, 184s.
- Natornicola, C., Boizet-Bonhoure, B., de Santa-Barbara, P., Osta, M. A., Cattan, D., Touitou, I. 2009. Characterization of new mutations in the 5'-flanking region of the familial Mediterranean fever gene. *Genes and Immunity*, 10 : 273-279.
- NCBI. 2018. MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEFV> location.
- NCBI. 2018. MEFV geninin cDNA dizisi. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Nir-Paz, R., Ben-Chetrit, E., Pikarsky, E., Hassin, D., Hasin, Y., Chajek-Shaul, T. 2000. Unusual presentation of familial Mediterranean fever: role of genetic diagnosis. *Ann Rheum Dis*, 59 : 836-838.

- Notarnicola, C., Didelot, M.N., Kone'-Paut, I., Seguret, F., Demaille, J., Touitou, I. 2002. Reduced MEFV Messenger RNA Expression in Patients With Familial Mediterranean Fever. *Arthritis&Rheumatism*, 46 (10) : 2785-2793.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. 2007. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. ISBN: 978-1-4160-3080-5, USA, 600s.
- Oktem, S., Yavuzsen, T. U., Sengül, B., Akhunlar, H., Akar, S., Tunca, M. 2004. Levels of interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor (sIL-6R) in familial Mediterranean fever (FMF) patients and their first degree relatives. *Clin Exp. Rheumatol*, 22(34) : 34-36.
- Onen, F. 2006. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*, 26 : 489-496.
- Ozalkaya, E., Mir, S., Sozeri, B., Berdeli, A., Mutlubas, F., Cura, A. 2011. Familial Mediterranean fever gene mutation frequencies and genotype-phenotype correlations. *Rheumatol Int*, 31 : 779-784.
- Ozen, S., Ben-Chetrit, E., Bakkaloglu, A., Gur, H., Tinaztepe, K., Calguneri, M., Turgan, C., Turkmen, A., Akpolat, I., Danaci, M., Besbas, N., Akpolat, T. 2001. Polyarteritis Nodosa in Patients with Familial Mediterranean Fever (FMF): A Concomitant Disease or a Feature of FMF? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 30 (4) : 281-287.
- Ozkayar, N., Piskinpasa, S., Akyel, F., Dede, F., Yildirim, T., Turgut, D., Koc, E., Haznedaroglu, İ.C. 2013. Evaluation of the mean platelet volume in secondary amyloidosis due to familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int.*, 33 (10) : 2555-2559.
- Ozturk, C., Halıcıoğlu, O., Coker, I., Gulez, N., Sutçuoğlu, S., Karaca, N., Aksu, G., Kutukçuler, N. 2012. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clin Rheumatology*, 31 : 493-501.
- Örün, E., Yalçınkaya, F. 2003. Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve amiloidoz. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*, 12 (1) : 1-7.
- Özen, S., Batu, E.,D., Demir, S. 2017. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Front.Immunol.*, 8 (253) :1-11.
- Padeh, S., Berkun, Y. 2016. Familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol*, 28:523-529.
- Peynircioğlu,B.,Yılmaz, E. 2006. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının moleküler temeli. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 37 : 223-229.
- Pras, M. 1998. Familial Mediterranean Fever: From the Clinical Syndrome to the Cloning of the Pyrin Gene. *Scand J Rheumatol*, 27 : 92-97.

- Rahman, M.T., Uddin, M.S., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4 (1) : 30-36.
- Ravi, I., Baunthiyal, M., Saxena, J. 2014. *Advances in Biotechnology*. ISBN: 978-81-322-1553-0, India, 264s.
- Saglam, C., Polat, A., Jones, Y., O., Demirkaya, E. 2013. Recent advances in the management of children with familial Mediterranean fever. *Int. J. Clin. Rheumatol.*, 8 (2) : 233-245.
- Salehzadeh, F. 2015. Familial Mediterranean Fever in Iran: A Report from FMF Registration Center. *International Journal of Rheumatology*, 2015 : 912137.
- Samli, H., Doğru, O., Bukulmez, A., Yuksel, E., Ovali, F., Solak, M. 2006. Relationship of Tel Hashomer criteria and Mediterranean fever gene mutations in a cohort of Turkish familial Mediterranean fever patients. *Saudi Med J* 27 (12) : 1822-1826.
- Samuels, J., Aksentijevich, I., Torosyon, Y., Centola, M., Deng, Z., Sood, R., Kastner, L. 1998. Familial Mediterranean Fever at the Millenium Clinical Spectrum, Ancient Mutations, and a Survey of 100 American Referrals to the National Institutes of Health. *Medicine*, 77 : 268-97.
- Samuels, J., Ozen, S. 2006. Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Current Opinion in Rheumatology*, 18 : 108-117.
- Sarı, İ., Birlik, M., Kasifoglu, T. 2014. Familial Mediterranean fever: An updated review. *European Journal of Rheumatology*, 1 : 21-33.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc.*, 3 (6) : 1101-8.
- Seifi, M., Ghaemi, A., Heidarzadeh, S., Khosravi, M., Namipashaki, A., Soofiany, V.M., Khosroshahi, A.A., Danaei, N. 2012. Overview of Real-Time PCR Principles. *Intechopen*, 19 : 405-442.
- Settin, A., El-Baz, R., Abd Rasool, M., El-Khalegy, H., El-Sayed, O., El-Bendary, M., Al-Nagar, A-S.M. 2007. Clinical and Molecular Diagnosis of Familial Mediterranean Fever in Egyptian Children. *J Gastrointestin Liver Dis.*, 16 (2) : 141-5.
- Shohat, M., Halpern, G. J. 2011. Familial Mediterranean fever-A review. *Genetics in Medicine*, 13 (6) : 487-498.
- Shohat, M., Magal, N., Shohat, T., Chen, X., Dogan, T., Mimouni, A., Danon, Y., Lotan, R., Ogur, G., Sirin, A., Schlezinger, M., Halpern, G. J., Schawabe, A., Kastner, D., Rotter, J. I., Fischel-Ghodsian, N. 1999. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *European Journal of Human Genetics*, 7 : 287-292.
- Solanki, G. 2012. Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2 (3) : 98-102.

- Sonmez, H. E., Batu, E. D., Ozen, S. 2016. Familial Mediterranean fever: current perspectives. *Journal of Inflammation Research*, 9 : 13-20.
- Soriano, A., Manna, R. 2012. Familial Mediterranean fever: New phenotypes. *Autoimmunity Reviews*, 12 : 31-37.
- Tasliyurt, T., Serbulent, Y., Rustemoglu, A., Gul, U., Ates, O. 2013. Common MEFV gene mutations in Turkish patients with Behcet's disease. *Gene*, 530 : 100-103.
- The International FMF Consortium. 1997. Ancient Missense Mutations in a New Member of the RoRet Gene Family Are Likely to Cause Familial Mediterranean Fever. *Cell*, 90 : 797-807.
- Touitou, I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*, 9 : 473 – 483.
- Turkish FMF Study Group. 2005. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine*, 84 : 1-11.
- Ustek, D., Ekmekci, C. G., Selcukbiricik, F., Cakiris, A., Oku, B., Vural, B., Yanar, H., Taviloglu, K., Ozbek, U., Gül, A. 2007. Association Between Reduced Levels of MEFV Messenger RNA in Peripheral Blood Leukocytes and Acute Inflammation. *Arthritis&Rheumatism*, 56 (1) : 345-350.
- Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29 : 151-159.
- Valones, M.A.A, Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., de Souza, P.R.E, Tavares Carvalho, A.A.T., Crovela, S. 2009. Principles and applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields: A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 : 1-11.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39 (1) : 1-11.
- Yalçinkaya, F., Cakar, N., Misirlioğlu, M., Tümer, N., Akar, N., Tekin, M., Tastan, H., Koçak, H., Ozkaya, N., Elhan, A. H. 2000. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology*, 39 (1) : 67-72.
- Yalçinkaya, F., Ozçakar, B., Kasapçopur, O., Oztürk, A., Akar, N., Bakkaloglu, A., Arisoy, N., Ekim, M., Ozen, S. 2007. Prevalence of the MEFV Gene Mutations in Childhood Polyarteritis Nodosa. *The Journal of Pediatrics*, 151 (6) : 675-678.
- Yazici, A., Cefle, A., Savli, H. 2012. The frequency of MEFV gene mutations in Behcet's disease and their relation with clinical findings. *Rheumatol Int*, 32 : 3025-3030.
- Yılmaz, E., Balcı, B., Kutlay, S., Özen, S., Ertürk, S., Öner, A., Beşbaş, N., Bakkaloğlu, A. 2003. Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2, and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 45 : 198-202.

- Yilmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Duzova, A., Topaloglu, R., Besbas, N., Saatci, U., Bakkaloglu, A., Ozguc, M. 2001. Mutation Frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European Journal of Human Genetics*, 9 : 553-555.
- Zadeh, N., Getzug, T., Grody, W.W. 2011. Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: Integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genetics in Medicine*, 13 (3) : 263-269.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Eda GANIYUSUFOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 12.12.1987/ Kahramanmaraş
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0537 456 79 79
e-posta : eda.ganiyusufoglu@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ /Tıp Fakültesi/Biyokimya Anabilim Dalı	2013
Lisans	KSÜ/ Fen Edebiyat Fakültesi/Kimya Bölümü	2010
Lise	Ankara Anıttepe Lisesi	2005

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2011-2013	KSÜ	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

İndeksli Dergide Yayınlanan Makaleler

1. Kilinc M, **Ganiyusufoglu E**, Sager H, Celik A, Olgar S, Cetin GY, Davutoglu M, Altunoren O. The report of sequence analysis on familial Mediterranean fever gene (MEFV) in South-eastern Mediterranean region (Kahramanmaraş) of Turkey. *Rheumatol Int.* 2016 Jan;36(1):25-31. doi: 10.1007/s00296-015-3329-7
2. Yildirim Cetin G, **Ganiyusufoglu E**, Solmaz D, Cagatay Y, Yılmaz Oner S, Erer B, Sagliker HS, Avcı AB, Akar S, Pamuk ON, Kılınç M, Kasifoglu T, Direskeneli H, Gul A, Sayarlioglu M. The rate and significance of type 1/type 2 serum amyloid A protein gene polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis and amyloidosis. *Amyloid.* 2015;22(3):207-8. doi: 10.3109/13506129.2015.1068751.
3. Ozdemir G, Ergün Y, Bakariş S, Kılınç M, Durdu H, **Ganiyusufoglu E**. Melatonin prevents retinal oxidative stress and vascular changes in diabetic rats. *Eye (Lond).* 2014 Jun 13. doi: 10.1038/eye.2014.127.
4. Gurkan Acar M.D., Hasan Kahraman M.D., Murat Akkoyun M.D., Metin Kilinc M.D., Cemil Zencir M.D., **Edagani Yusufoglu M.D.**, Imran Dirnak M.D., Hatice Sahin M.D., Soner Olmez M.D., Ahmet Akcay M.D., Idris Ardic M.D. Evaluation of atrial electromechanical delay and its relationship to inflammation and oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Echocardiography.* 2014 May;31(5):579-85. doi: 10.1111/echo.12442.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Kılınç M., **Ganiyusufoglu E.**, Sayarlioglu M., Sayarlioglu H., Şahin E., Çiftçi S., Çetin Yildirim G., Yavuz Coşkun Y. 2012. Kahramanmaraş Yöresindeki Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Olgularının Sekans Analiz Sonuçlarına Göre Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi. XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Marmaris.
2. Kılınç M., Çiftçi S., Şahin E., Ganiyusufoglu E., Resim S., Bulut B.B., Bahar M. R., Tolun İnanç F., Çelik A. 2012. İnfrared (FTIR) Cihazında Çalışılan Böbrek Taşları Analiz Sonuçlarının Kimyasal Açından Değerlendirilmesi. XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Marmaris.

3. Kılınç M., Çiftçi S., Şahin E., Atalay F., Arıkan C. D., Arıkan T., **Ganiyusufoglu E.** 2012. Karyotip Analizi Sonucu Normal Bulunan Gebelerin Amnion Sıvılarında Eser Element (Çinko, Bakır ve Selenyum) Düzeylerinin İncelenmesi. XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Marmaris.
4. Yıldırım Çetin G., **Ganiyusufoglu E.**, Solmaz D., Çağatay Y., Yılmaz Öner S., Erer B., Sağlık H. S., Avcı A. B., Akar S., Pamuk Ö. N., Kılınç M., Kaşifoğlu T., Direskeneli H., Sayarlıoğlu M. 2013. Ankilozan Spondilit Hastalarında Amiloidoz ile MEFV Geni Varyasyonları ve Serum Amyloid A Proteini Geni Allellerinin İlişkisi. XIV. Ulusal Romatoloji Kongresi, İzmir.
5. Çiftçi S., Şahin E., Çelik A., Sarıçiçek E., Sezen H., **Ganiyusufoglu E.**, Kılınç M. 2013. Viseral Adiposite İndeksi ile Beta Hücre Fonksiyonu, HOMA-IR ve Serum Adiponektin Düzeyleri İlişkisi. XIII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, İzmir.
6. Yıldırım Çetin G., **Ganiyusufoglu E.**, Solmaz D., Çağatay Y., Yılmaz Öner S., Erer B., et al. Association Between The Presence Of Amyloidosis In Patients With Ankylosing Spondylitis And Polymorphisms In Type 1/Type 2 Serum Amyloid A Protein Genes, Mediterranean Fever Genes. Arthritis Rheum, 2013; 65. Suppl 10: 523. San Diego.
7. Metin Kilinc, **Eda Ganiyusufoglu**, Hatice Sager, Ahmet Celik, Seref Olgar, Gozde Yildirim Cetin, Mehmet Davutoglu, Orcun Altunoren. 2016. The Report of Sequence Analysis on Familial Mediterranean Fever Gene (MEFV) in South-Eastern Mediterranean Region(Kahramanmaras) of Turkey. International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), Adana. (Sözlü Sunum)
8. Metin Kilinc, Hatice Sager, **Eda Ganiyusufoglu**, Yeliz Dobooglu, Hasan Daglı. 2016. Do We Benefit from Sun Rays in Winter Enough? International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), Adana. (Sözlü Sunum)
9. Rumeysa Duyuran, Metin Kılınç, **Eda Ganiyusufoglu**, Hasan Daglı. Değişik Nedenlerle Hastaneye Başvuran Kişilerde Demir Eksikliği, Demir Eksikliği Anemisi, Talasemi ve Orak Hücre Taşıyıcı Sıklığının Araştırılması. 2016. International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), Adana. (Poster)

10.Ömer Celil Korkmaz, Metin Kılınç, **Eda Ganiyusufoglu**, Hasan Dağlı. Eritropoietin (EPO) Kullanan ve Kullanmayan Diyaliz Hastalarında Hematolojik Parametrelerin İncelenmesi. 2016. International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC), Adana. (Poster)

11. Ayşe Hedef, Metin Kılınç, **Eda Ganiyusufoglu**, Hasan Dağlı. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Mutasyon Tiplerine Göre Hematolojik Parametreler ve Akut Faz Reaktanları Düzeyleri. 2017. 17. Uluslararası Katılımlı Klinik Biyokimya Kongresi, Acapulco Otel Girne, Kıbrıs.

Toplantı ve Seminerler

- 1.** Tıpta inovasyon buluşmaları 1, Moleküler Tıpta Biyomühendislik ve İnovasyon, 2015. Sanko Üniversitesi, GAZİANTEP.
- 2.** "Kanser tedavisinde immunoterapi" konulu seminer, Sanko Üniversitesi, GAZİANTEP.
- 3.** "Beslenmenin kanser ve bağışıklık sistemi üzerine etkisi" konulu seminer, Sanko Üniversitesi, GAZİANTEP