

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

132351

ÇUKUROVA YÖRESİNDEKİ AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ  
HASTALARINDA MEFV GENİ 10. EKZON MAJÖR  
NOKTA MUTASYONLARI SIKLIĞININ  
İNCELENMESİNDE ARMS VE PCR-RFLP  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

132351

Ramazan GÜNEŞAÇAR

DOKTORA TEZİ  
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Dr. Halil KASAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE 2002 D15  
nolu proje olarak desteklenmiştir

Tez No:.....

ADANA-2003

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Ramazan GÜNEŞAÇAR tarafından Doktora programı çerçevesinde yürütülmüş olan "ÇUKUROVA YÖRESİNDEKİ AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA MEFV GENİ 10.EKZON MAJÖR NOKTA MUTASYONLARI SIKLIĞININ İNCELENMESİNDE ARMS VE PCR-RFLP YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

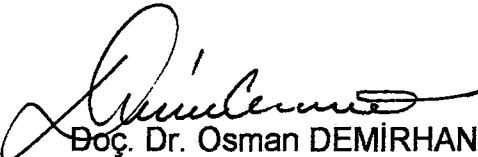
Tez Savunma Tarihi: 10.07.2003

  
Prof. Dr. Halil KASAP  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Eren ERKEN  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Mülkiye KASAP  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Engin YILMAZ  
Hacettepe Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Osman DEMİRHAN  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 23.9.2003 tarih ve 15/25-11.....sayılı Kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Sait POLAT  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim esnasında bana yol gösteren ve her konuda yardımcı olan değerli hocam ve tez danışmanım **Sayın Prof. Dr. Halil KASAP**'a, doktora eğitimim öncesi ve süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, destek ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam **Sayın Prof. Dr. Eren ERKEN**'e, tez dönemi boyunca "**Tez İzleme Komitesi**"nde görev alarak yapıcı eleştirileri ile bana yardımcı olan değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP**'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı öğretim elemanlarına, laboratuvar personeline ve akademik hayatım boyunca manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim **Hatice GÜNEŞAÇAR** ile hayatımın anlamı olan kızlarım **Gülşen** ve **Gamze**'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmamı SBE 2002 D15 nolu proje olarak destekleyen **Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ	2
2.1.1. TANIM	2
2.1.2. TARİHÇE	2
2.1.3. GENETİK	3
2.1.4. EPİDEMİYOLOJİ	6
2.1.5. PATOGENEZ	7
2.1.6. GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ	8
2.1.7. LABORATUVAR TESTLERİ	8
2.2. MEFV GEN MUTASYONLARININ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAZI MOLEKÜLER YÖNTEMLER	9
2.2.1. ARMS-PCR	9
2.2.2. PCR-RFLP	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	11
3.1.1. CİHAZLAR	11
3.1.2. KİMYASAL MADDELER	11
3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN SAĞLANMASI	12
3.3. YÖNTEMLER	13
3.3.1. DENEYLERDE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI	13
3.3.1.1. STOK SOLÜSYONLAR	13
3.3.1.2. DNA ELDESİ SOLÜSYONLARI	14
3.3.1.3. ELEKTROFORETİK ANALİZ SOLÜSYONLARI	16
3.3.2. DNA ELDESİ	17
3.3.2.1. DNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ	18
3.3.3. MEFV GENİNİN 10. EKZONUNDA MEYDANA GELEN M694V, M694I, M680I ve V726A MUTASYONLARININ ARMS TEKNİĞİ İLE SAPTANMASINDA KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ	19
3.3.3.1. ARMS YÖNTEMİ İLE MEFV GENİ 10. EKZON MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ	20
3.3.3.2. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	22

3.3.4. MEFV GENİNİN 10. EKZONUNDA MEYDANA GELEN M694V, M694I, M680I ve V726A MUTASYONLARININ PCR-RFLP TEKNİĞİ İLE SAPTANMASINDA KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ	22
3.3.4.1. PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE MEFV GENİ 10. EKZON MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ	23
3.3.4.2. PCR ÜRÜNLERİNİN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMLERİ İLE KESİMİ	24
3.3.4.3. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
7. KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** ARMS-PCR yöntemiyle belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi görüntüsü 31
- Şekil 4.2.** PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen M694V ve M694I mutasyonlarının %12 poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü 31
- Şekil 4.3.** PCR-RFLP tekniği ile belirlenen M680I ve V726A mutasyonlarının %12 poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü 32
- Şekil 4.4.** M680I ve V726A heterozigot iki hastaya ait PCR ürünlerinin aynı tüpte Hinf I ve Alu I enzimleriyle kesilmiş DNA fragmanlarının poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü 32



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> M694V, M694I, M680I ve V726A ARMS primer dizileri	20
<b>Çizelge 3.2.</b> Optimum amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı	21
<b>Çizelge 3.3.</b> M694V, M680I ve V726A mutasyonları için uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri (PCR programı)	21
<b>Çizelge 3.4.</b> M694I mutasyonu için uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri	21
<b>Çizelge 3.5.</b> M694V, M694I, M680I ve V726A PCR-RFLP primerleri	23
<b>Çizelge 3.6.</b> M694V, M694I, M680I ve V726 mutasyonları için optimum amplifikasyonun gerçekleştiği reaksiyon karışımı	23
<b>Çizelge 3.7.</b> M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonları için PCR programı	24
<b>Çizelge 3.8.</b> M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının kesim reaksiyonu karışımı	24
<b>Çizelge 3.9.</b> M680I ve V726A heterozigot mutasyonlarını birlikte bulunduran hastaların PCR ürünlerinin HinfI ve AluI enzimleriyle aynı tüpteki kesim reaksiyonu karışımı	25
<b>Çizelge 4.1.</b> AAA hastalarının isim, yaş ve cinsiyetleri	27
<b>Çizelge 4.2.</b> AAA hastalarının doğum yerleri	29
<b>Çizelge 4.3.</b> AAA hastalarının bazı fenotipik özellikleri	29
<b>Çizelge 4.4.</b> AAA hastalarında genotipik özelliklerin hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı ve aile öyküsü ile karşılaştırılması	30
<b>Çizelge 4.5.</b> AAA hastalarında genotipik özelliklerin bazı klinik özelliklerle karşılaştırılması	30

<b>Çizelge 4.6.</b> M694V, M694I, M680I ve V726A MEFV gen mutasyonlarının 50 AAA hastasındaki (100 allel) sıklığı	33
<b>Çizelge 4.7.</b> AAA hastalarında M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının dağılımı	33
<b>Çizelge 4.8.</b> ARMS yöntemi ile belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının analiz süreleri	34
<b>Çizelge 4.9.</b> PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının analiz süreleri	34
<b>Çizelge 4.10.</b> ARMS yöntemi ile M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının ABD Doları cinsinden maliyeti	34
<b>Çizelge 4.11.</b> PCR-RFLP yöntemi ile M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının ABD Doları cinsinden maliyeti	35



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
MEFV geni	MEditerranean FeVer geni (Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı geni)
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi)
Rpt 1	Regülatör protein T-lenfosit 1
Xnf7	Xenopus nükleer faktör-7
A	Adenin
T	Timin
C	Sitozin
G	Guanin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
mRNA	Messenger (ulak) ribonükleik asit
bç	Baz çifti
TBE	Tris-Borik asit-EDTA tamponu
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> O	Su
BSA	Bovine (dana) serum albumin
M	Molar konsantrasyon
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
U	Ünite
pH	Hidrojen iyonları konsantrasyonu
ABS	Absorbans
UV	Ultraviyole
dk	Dakika
sn	Saniye

## ÖZET

### **Çukurova Yöresindeki Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında MEFV Geni 10. Ekzon Majör Nokta Mutasyonları Sıklığının İncelenmesinde ARMS ve PCR-RFLP Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) tekrarlayan ateş, abdominal ağrı, artrit ve plörit ile karakterize, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Hastalık Akdeniz havzası populasyonlarında oldukça sık görülmektedir. Son yıllarda AAA hastalığından sorumlu olan gen (MEFV geni) klonlanmış ve günümüze kadar 29 MEFV gen mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar içinde en sık görülenler 10. ekzon majör nokta mutasyonları olan M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının MEFV allellerinin %85'inde bulunduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada Çukurova Yöresinde yaşayan ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 50 AAA hastasında MEFV geni 10. ekzon majör nokta mutasyonları olan M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının sıklığı ARMS ve PCR-RFLP yöntemleriyle incelendi ve mutasyonların belirlenmesinde kullanılan bu iki yöntem güvenilirlik, zaman ve ekonomik açıdan karşılaştırıldı.

Çalışmaya alınan 50 hastanın bağımsız allellerinin %75'inde mutasyon bulundu ve hastalarımızın 12 farklı genotipe sahip oldukları gözlemlendi. Hastaların 31'inde (%62) her iki allelde de mutasyon saptandı. Aynı mutasyon yönünden homozigot mutant hasta sayısı 13 (%26), mutasyonların farklı kombinasyonlarını bir arada bulduran (birleşik heterozigot) hasta sayısı 18 (%36), biri mutant diğeri bilinmeyen heterozigot hasta sayısı ise 13 (%26) olarak belirlendi. Altı hastada (%12) ise incelediğimiz mutasyonlardan herhangi biri saptanamadı. En sık görülen mutasyonlar sırasıyla M694V %43, M680I %20, V726A %9 ve M694I %3 olarak belirlendi. Mutasyonların araştırılmasında kullanılan ARMS ve PCR-RFLP yöntemlerinin her ikisinin de güvenilir oldukları, bununla birlikte ARMS yönteminin PCR-RFLP'ye göre daha hızlı, pratik ve ekonomik olduğu belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** Ailevi Akdeniz Ateşi , ARMS, MEFV, Mutasyon, PCR-RFLP

## ABSTRACT

### Comparison of ARMS and PCR-RFLP Techniques used for the Investigation of MEFV Gene Exon 10 Point Mutations in Familial Mediterranean Fever Patients Living in Çukurova Region

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive inherited disease characterized by recurrent fever, abdominal pain, arthritis and pleurisy. The disease is highly prevalent in the Mediterranean basin populations. Recently, the gene responsible for FMF (MEFV) was cloned and 29 MEFV gene mutations have been identified up to now. The most frequently observed mutations in the MEFV gene are M694V, M694I, M680I and V726A mutations which occur within the exon 10 of the gene, and account for 85% of the MEFV alleles.

In this study, we analyzed frequencies of the M694V, M694I, M680I and V726A major point mutations within the exon 10 of the MEFV gene of the 50 unrelated FMF patients living in Çukurova region using ARMS and PCR-RFLP techniques, and these two techniques were compared for their reliability, timing and economical view points.

The ratio of independent alleles of 50 patients carrying one of the tested mutations was 75% and patients are consisted of 12 different genotypes. In 31 of 50 patients (62%) the mutations were observed in both alleles. It was determined that 13 patients (26%) were homozygous for the same mutation, 18 (36%) were compound heterozygous for different combinations of the mutations. Thirteen patients (26%) were heterozygous for one allele with one of the tested mutations but the other allele unknown. In six patients (12%) none of the searched mutations could be detected. The most frequently observed mutation was M694V as 43%, followed by M680I as 20%, V726A as 9% and M694I as 3%. It was also observed that both of the ARMS and PCR-RFLP techniques were reliable to detect the mutations. However, the ARMS technique was found to be more rapid, practical and economical than the PCR-RFLP.

**Key words:** Familial Mediterranean Fever, ARMS, MEFV, Mutation, PCR-RFLP

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) Türk, Yahudi, Ermeni ve Arap populasyonlarında sık görülen, ateş, abdominal ağrı, artrit ve plörit atakları ile karakterize otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır<sup>1,2</sup>. AAA hastalığı geninin (MEFV) 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolu üzerinde (16p13.3) lokalize olduğu saptandıktan sonra bu gen 1997 yılında Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından eş zamanlı ve birbirlerinden bağımsız olarak klonlanmıştır<sup>3,4,5</sup>. Her iki araştırma grubu bu ilk çalışmalarında AAA hastalarında M694V, M694I, M680I ve V726A nokta mutasyonlarının hastaların %85'inde mevcut olduğunu göstermişlerdir. MEFV geni 781 amino asitten ibaret olan ve pyrin ya da marenostrin adı verilen bir proteini kodlamaktadır. Nötrofiller tarafından eksprese edilen bu proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber inflamasyon olayının kontrolünde rol oynadığı ileri sürülmektedir<sup>4,5</sup>.

Bu tez çalışmasında, Çukurova yöresindeki AAA hastalarında hem Amplification Refractory Mutation System="ARMS" hem de Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism= "PCR-RFLP" moleküler yöntemlerini kullanarak MEFV geni 10. ekzon major nokta mutasyonlarından M694V, M694I, M680I ve V726A sıklığının araştırılması ve bu mutasyonları belirlemekte kullanılan iki yöntemin güvenilirlik, zaman ve ekonomik açıdan karşılaştırılması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)

**2.1.1. Tanım:** AAA Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap populasyonlarında sık görülen, etyolojisi tam olarak bilinmeyen, tekrarlayan ve kendini sınırlayan ateş, peritonit, sinovit ve plörit atakları ile karakterize olan ve tam bir penetrans gösteren otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır<sup>1,2</sup>.

**2.1.2. Tarihçe:** Genetik verilere göre AAA'nın miladın başından beri varolması beklendiği halde, kesin olmamakla birlikte ilk olgu bildirimini 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından tekrarlayan ateş, lökositoz ve ağrı şikayetleri olan 16 yaşındaki bir çocuğun bildirilmesiyle tanımlandığı kabul edilmektedir. Bunun yeni bir klinik antite olduğu 1945 yılında Siegel tarafından 10 olgunun tartışılmasıyla gerçekleşmiş ve "Benign Paroksizmal Peritonit" adı altında yayınlanmıştır. Daha sonra Sohar ve Heller'in tanımlamaları hastalığın birçok klinik yönünü açığa kavuşturmuştur. Önceleri bu hastalık için periyodik hastalık, periyodik ateş, periyodik peritonit, familial paroksizmal poliserozit, La maladie periodique, Ermeni hastalığı, benign paroksizmal peritonit gibi çok çeşitli isimler kullanılmıştır. Günümüzde bu hastalık için ailevi Akdeniz ateşi (familial Mediterranean fever) deyimini kullanılmaktadır<sup>6</sup>.

İlk kuşak AAA hastalığı araştırmacıları klinik özelliklerin karakterizasyonu ve tanımlanmasıyla ilgilenmişler, ikinci kuşak 1972 yılından itibaren AAA tedavisinde kolşisinin etki mekanizması üzerinde çalışmışlardır<sup>7</sup>. Üçüncü kuşak ise bu hastalıktan sorumlu olan genin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır<sup>8</sup>. Araştırmacılar bu amaçla başlangıçta inflamasyon mediatörleri ya da defektli proteinler üzerinde çalışmışlardır. Daha sonra bağlantı (linkaj) analizi ile hastalıktan sorumlu genin 17. kromozom üzerinde lokalize olduğu ileri sürülmüştür<sup>9</sup>. Ancak 1992 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde (NIH) AAA geninin haritası çıkarılarak 16. kromozomun kısa kolu üzerinde olduğu (16p13.3) tespit edilmiştir<sup>3</sup>. Daha sonra Amerika Birleşik Devletleri, İsrail ve Avustralya'dan birkaç grup birlikte Uluslararası AAA Konsorsiyumu'nu, İsrailli klinisyenler ve birkaç Fransız laboratuvarı bir araya gelerek ikinci birliktelik olan Fransız AAA Konsorsiyumu'nu kurmuşlardır.

Her iki konsorsiyum eşzamanlı ve birbirlerinden bağımsız olarak Pozisyonel klonlama yöntemi ile AAA hastalığı genini (MEFV; MEditerranean FeVer) izole etmişlerdir<sup>4,5</sup>. MEFV geninin belirlenmesiyle AAA hastalığında 1997 yılından itibaren yeni bir çağ açılmıştır.

**2.1.3. Genetik:** Monozigotik ikizlerinin AAA hastalığı açısından uyumlu olduğu Shohat et al<sup>10</sup>'nın 10 monozigotik ikiz kardeşler üzerinde yaptıkları çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada 10 monozigotik ikizlerin tamamında, 11 dizigotik ikizlerin ise sadece üçünde konkordans (uyum) bulunmuştur. Bununla birlikte monozigotik ikizlerde hastalığın şiddeti ve klinik görünümü farklılık gösterebilmektedir. Rogers et al.<sup>11</sup> AAA kalıtımının otozomal resesif olduğunu teyid etmişlerdir. AAA da erkek: kadın oranının 1'den fazla olması, kadınlarda penetransın muhtemelen tam olmadığına işaret etmektedir<sup>12</sup>.

Etkilenen ailelerde hastalığın genelde bir nesilde görülmesi genetik geçişin resesif olduğunu destekler. Bununla birlikte, akraba evliliği olan ailelerde AAA birbirini takip eden iki veya daha fazla nesilde görülebilir (psödodominant kalıtım). Bir çalışmada, içlerinde 240 AAA hastası bulunan 77 ailede hastalık farklı nesillerde görülmüş ve geçişin psödodominant olduğu ileri sürülmüştür. Ancak biri Aşkenaz Yahudi diğeri Irak orijinli iki ailede birbirini takip eden dört nesilde AAA hastaları bulunmuş ve genetik geçişin otozomal dominant kalıtım şeklinde olabileceği açıklanmıştır<sup>13</sup>. Bu ailelerdeki bozukluğun ayrı bir lokustaki mutasyon nedeniyle mi yoksa 16. kromozomdaki AAA lokusunda varyant allelin yer değişimiyle mi olduğuna moleküler genetik çalışmalar açıklık getirmiştir. Aksentijevich et al.<sup>14</sup> dört nesilde de AAA hastaları bulunan Aşkenaz Yahudi ailede yaptıkları moleküler çalışmada E148Q mutasyonunun penetransı artırdığını yani E148Q mutasyonunu taşıyan allelin ebeveynden çocuğa geçişinin daha sık olduğunu, dolayısıyla allellerdeki bu penetrans farkından dolayı genetik geçişin sanki otozomal dominantmış gibi olduğunu göstermişlerdir.

AAA hastalığı geninin 16. kromozomun kısa kolu üzerinde (16p13.3) lokalize olduğu saptandıktan sonra bu gen iki ayrı çalışma grubu tarafından eşzamanlı olarak klonlanmıştır<sup>4,5,15,16,17</sup>. Onaltıncı kromozomda yaklaşık 15 kb'lık bir bölge işgal eden



MEFV geni 10 ekzondan ibarettir. Bu genin 3.7 kb'lik transkripti polimorfonükleer lökositlerde eksprese edilerek, iki ayrı çalışma grubu tarafından iki farklı isimle adlandırılan marenostin (Fransız AAA Konsorsiyumu) ya da pyrin (Uluslararası AAA Konsorsiyumu) proteininin sentezlenmesini sağlamaktadır. Yediyüzseksenbir amino asitten ibaret olan 86kD'luk bu proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte inflamasyon olayının kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu proteine ateşle ilişkisini ifade etmek için pyrin ya da Akdeniz'in Latince ifadesi olan Mare nostrum (bizim deniz) ile ilişkilendirmek üzere marenostin adı verilmiştir. Bugüne kadar terminolojide henüz bir uzlaşma sağlanamamıştır<sup>12</sup>.

Pyrin DNA'ya bağlanma aktivitesi bulunan bazı proteinlerle benzerlik göstermektedir. Bunlar arasında Ro/SSA ribonükleoprotein, interferon indükleyici transkripsiyonel regülatör Staf 50, interlökin 2 reseptörünün "down" regülasyonunu sağlayan rpt-1 (regülatör protein T lenfosit 1), kurbağada mitotik kromozomlara bağlanan bir faktör olan Xnf7 (Xenopus nükleer faktör 7) ve butirofilini de kapsayan birkaç peptit sayılabilir. Ayrıca pyrin sekans motiflerinin bilgisayar analizi iki varsayımsal nükleer lokalizasyon sinyali ile birlikte bir bZIP transkripsiyon faktör domeini (DNA'ya bağlanabilen domein) ortaya koymakta olup bu bulgular pyrinin bir transkripsiyon faktörü olduğunu düşündürmektedir. Pyrinin karboksi terminal kısmı (300-781 amino asitler) bir "B-box zinc finger" (375-407. amino asitler) ve bir alfa helikal bölge (408-594. amino asitler) içermektedir. "B-box" ve alfa helikal bölge diğer proteinlerde buldukları zaman protein-protein interaksiyonuna yol açarlar, fakat intraselüler, transmembran ve salgılanan proteinlerde bulunabilen B30.2 parçasının fonksiyonu anlaşılamamıştır<sup>18,19,20</sup>.

Pyrin proteininin amino terminal bölgesi (1-300. amino asitler) diğer proteinlerle benzerlik göstermemekle birlikte son yıllarda bu bölge ile benzerlik gösteren birkaç protein bulunmuş ve bunlara pyrin domeini (PyD) adı verilmiştir.<sup>21</sup> PyD, 95 amino asitten ibaret olup ölüm domeinleri (death domains=DD), ölüm efektör domeinleri (death effector domains=DED) ve kaspaz çalıştırıcı domeinleri de (caspase recruitment domains=CARD) kapsayan ölüm domeini süperailisinin üyesidir. Ölüm domeini süperailisinin üyeleri apoptos ve inflamasyon proteinlerinin birçoğunda bulunmakta ve protein-protein interaksiyonunu sağlamaktadırlar.<sup>22</sup> PyD ve CARD proteinleri birleşerek proapoptotik bir molekül olan apoptos speck proteini (ASC) oluşturur. ASC

nötrofillerde pyrin ile bağlanarak ASC ile indüklenmiş apoptozisi module eder.<sup>21</sup> Şiddetli inflamasyonun bulunduğu alanlarda, nötrofillerde ASC ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Proinflamatuvar mediatörler nötrofillerde ASC ekspresyonunu in-vitro olarak artırmaktadır. ASC'nin anti-Fas antikoru ya da eriyebilir Fas ligandı ile arttığı, bununla birlikte Fas aracılı indüksiyonun kaspaz inhibitörleriyle inhibe edildiği saptanmıştır. Bu bulgular ASC'nin nötrofil inflamasyonu ve apoptozisi ile yakın ilişki içinde olduğunu göstermektedir. Nötrofiller inflamasyon alanındaki fonksiyonlarını tamamladıktan sonra apoptozise girerler, fakat nötrofillerin apoptozisini düzenleyen kesin mekanizma bilinmemektedir.<sup>23</sup> Pyrin proteininin biyolojik fonksiyonu muhtemelen inflamasyon mediatörlerinin “down” regülasyonu ve nötrofillerin apoptozisidir. Mutant pyrin proteininin bu fonksiyonu yerine getirmede daha az etkili olabileceği düşünülmektedir.<sup>24</sup>

MEFV geninin 10. ekzonunda (pyrin'in karboksi terminal kısmını kodlayan ekzon) birkaç konservatif missens mutasyon belirlenmiştir. M694V, M680I ve V726 mutasyonları her iki konsorsiyum tarafından da keşfedilmiştir. Fransız AAA Konsorsiyumu ayrıca dördüncü bir mutasyon (M694I) daha belirlemiştir. Bu üç mutasyondan en az birisi taşıyıcı kromozomların %85'inde bulunmuş, ancak 15'inde henüz gösterilememiştir<sup>4,5</sup>. Günümüze kadar MEFV gen bölgesinde en az 29 mutasyon saptanmış, bunların çoğunun missens mutasyon olduğu gözlenmiştir. Bilinen 29 gen mutasyonundan 26'sı missens mutasyonlar, 2'si küçük delesyonlar ve 1 tanesi de nonsens mutasyon şeklinde olup bu mutasyonlar içinde en sık görülen 5 mutasyon (M694V, M694I, M680I, V726A, E148Q) %74, diğer 24 mutasyon %1 ve henüz bilinmeyen mutasyonlar ise %25 oranındadır<sup>25</sup>.

M694V mutasyonu MEFV geninin 2080. pozisyonundaki adenin nükleotidi yerine guanin nükleotidinin geçmesiyle oluşan nokta mutasyonu ile (2080 A→G) pyrin proteininde 694. pozisyonunda bulunan metionin yerine valin amino asiti girmektedir.<sup>5</sup> M694I mutasyonunda MEFV geninin 2082. pozisyonundaki guanin yerine adenin geçerek (2082 G→A) sentezlenen proteinin 694. pozisyonundaki metionin yerine izolösin girmektedir<sup>4</sup>. M680I mutasyonunda, genin 2040. pozisyonundaki nükleotid normalde guanin iken buradaki bir nokta mutasyonu sonucu bunun yerine sitozin geçmekte (2040 G→C) ve bu kodonun kodladığı amino asit değişerek, proteinin 680. pozisyonundaki metionin yerine izolösin girmektedir.<sup>4</sup> Aksentijevich et al.<sup>14</sup> ise yine 2040. pozisyonundaki



guanin nükleotidinin adeninle yer değiştirmesiyle (2040 G→A) M680I mutasyonunun ortaya çıktığını göstermişlerdir. V726A mutasyonu MEFV geninin 10. eksonunda meydana gelmekte ve burada da genin 2177. pozisyonundaki timin, sitozinle yer değiştirmekte (2177 T→C) dolayısı ile sentezlenen pyrin proteininin 726. pozisyonundaki valin yerine alanin girmektedir<sup>5</sup>.

**2.1.4. Epidemiyoloji:** AAA hastalığı tartışılmaz bir etnik dağılım göstermektedir. Hastalık Türk, Yahudi, Ermeni ve Araplarda sık görülür. Özellikle kuzey Afrikalı Sefardik (Endülüs-İspanya) Yahudiler bildirilen olguların %60'ını oluştururlar, aynı zamanda hastalığın en şiddetli seyrettiği ve amiloidozun en çok görüldüğü etnik gruptur. AAA hastalarının %30'unu Ermeniler, %10'unu da diğer Akdeniz ülke populasyonları oluşturur. Almanya, Polonya, Avustralya ve Brezilya'dan da AAA hastaları rapor edilmiş fakat bu hastaların etnik kökenleri tam olarak açıklanmamıştır.<sup>26,27</sup>

İsrail'de yaklaşık 5000 AAA hastası mevcut olup, prevalans yaklaşık olarak 1:500'dür. Ancak hastalık çeşitli non-Aşkenaz Yahudi alt grupları arasında eşit olarak dağılmamıştır. Örneğin Kuzey Afrika Yahudilerinde prevalans 1:256'dır<sup>27</sup>. Lübnan'da yaşayan 150 Ermeni AAA hastasında prevalans 1:500'dür. Ermeni AAA hastalarındaki bir çok bilgi Ermenistan dışındaki (Los Angeles, Lübnan) Ermeni topluluklarından elde edilmiştir<sup>11,28</sup>. Türkiye'de ülke çapında yaygın olmakla birlikte, AAA hastalarının çoğu Orta Anadolu kökenlidir.<sup>29</sup>

Taşıyıcılık frekansı populasyonlar arasında farklılık göstermekte olup Kuzey Afrika Yahudilerinde 1:6.4, Irak Yahudilerinde 1:13.3'dür<sup>30</sup>. Bir başka çalışmada, taşıyıcılık frekansı Kuzey Afrika Yahudilerinde 1:6-1:8, İsrail'de 1:11 olarak hesaplanmıştır<sup>27</sup>. Ermenilerde 1:7, Türklerde ise 1:5'dir<sup>11,31</sup>. Gersoni-Baruch et al.<sup>32</sup> ise taşıyıcılık frekansını Aşkenaz Yahudiler, Fashılar, Irak Yahudileri ve Müslüman Araplarda sırasıyla 1:4.5, 1:4.7, 1:3.5 ve 1:4.3 olarak bildirmişlerdir.

MEFV geninin izolasyonu ve çeşitli etnik gruplardaki mutasyonların prevalansı AAA'nın etnik köken incelenmesi üzerinde bazı hipotezlerin kurulmasına imkan vermiştir. M694V mutasyonu Kuzey Afrika Yahudileri ve Ermenilerde olduğu kadar Irak Yahudilerinde de mevcuttur. Halbuki V726A mutasyonu Iraklı ve non-Aşkenaz

Yahudiler, Dürziler ve Ermenilerde sık bulunmaktadır. Bu bulgular göstermektedir ki, her iki mutasyon da (M694V, V726A) çok eskidir ve muhtemelen 2500 yıl önce Orta Doğu'da ortaya çıkıp, oradan Avrupa, Kuzey Afrika ve Ermenistan'a yayılmıştır<sup>27</sup>.

**2.1.5. Patogenez:** AAA'da inflamatuvar reaksiyon sonucu plevra, periton ve sinovyum gibi serozal dokular etkilenmektedir. Atak sırasında polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik aktivitesi artarak granüositler serozal dokulara yönelir.<sup>33</sup> Fiziksel ve psikolojik stres, menstruasyon ve aşırı yağlı diyet atağı tetikleyebilir<sup>27</sup>.

Birkaç hipotez mevcut olmakla birlikte son zamanlara kadar AAA'nın biyokimyasal ve moleküler temeli bilinmemekteydi. AAA'nın, inflamasyon mediatörlerinin biosentezinde görevli bir protein olan lipokortin bozukluğuna bağlı olarak geliştiği ya da C1 esteraz inhibitör defekti ile ortaya çıkan kalıtsal anjio-ödeme benzer inflamasyon yanıtını düzenleyen bir inhibitörü kodlayan genin defekti sonucu ortaya çıktığı iddia edilmiştir<sup>27</sup>. Matzner et al.<sup>34</sup> AAA'nın peritoneal sıvı ve eklemlerde C5a inhibitör aktivitesinin yetersizliği sonucu ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar granüositler için oldukça güçlü bir kemoatraktan olan C5a'yı inhibe edecek olan inhibitör eksikliğinin akut inflamatuvar atağa neden olabileceğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise metaraminol infüzyonunun akut atağı provoke ettiğini, dolayısıyla AAA hastalığının katekolamin metabolizmasıyla ilişkili olabileceğini iddia etmişlerdir<sup>35</sup>. Bu hipotezlerin hiçbirisi henüz doğrulanmamıştır. AAA klinik olarak otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusa benzemekle birlikte steroid ve diğer immunosüpresif ajanlara cevap vermemektedir, ayrıca AAA'da otoantikolar gösterilememiştir<sup>36,37</sup>.

MEFV gen ürünü olan pyrin fonksiyonunun anlaşılmasıyla sadece AAA patogenezi değil aynı zamanda genel olarak inflamasyon döngüsü de aydınlatılabilecektir. Kemik iliği hücrelerinde MEFV mRNA'sı belirlenememiştir<sup>5</sup>. Pyrinin yaygın olarak olgun nötrofillerde eksprese edilmesi bu proteinin muhtemelen inflamasyon mediatörlerinin "down" regülasyonunu sağladığını düşündürmektedir<sup>4,5</sup>. Nötrofiller akut inflamasyonun major hücreleri olduğundan, pyrinin bu hücrelerdeki rolü önemli olabilir. Burada diğer önemli bir nokta ise sinovyal ve peritoneal hücrelerdeki pyrin ekspresyonunun yetersizliği bu proteinin doku spesifik tarzda etkili

olmadığını göstermektedir<sup>27</sup>. AAA hastalarında MEFV mRNA ekspresyonu sağlıklı kişilere göre düşük düzeyde bulunmuştur<sup>38</sup>. Mutasyon nedeniyle pyrinin görev yapamaması, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna ve bu hücrelerin serozal dokulara göçüne neden olabilir. Bununla birlikte hedefin niçin serozal dokular olduğu açıklık kazanmamıştır<sup>27</sup>.

**2.1.6. Genotip-Fenotip İlişkisi:** MEFV geninin tanımlanması, hastalığın klinik bulguları ile özgül genotipler arasındaki ilişkinin araştırılmasına olanak sağlamıştır. M694V homozigotluğu ile amiloidoz arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda veri mevcuttur. Bu mutasyonun amiloid riskinin yüksek olduğu Kuzey Afrika Yahudi popülasyonunda çok sık rastlanan mutasyon olması dikkatleri çekmiş ve böyle bir birlikteliğin nedeni bu popülasyonda muhtemel ikinci bir polimorfizmin varlığına bağlı olabilir diye düşünülmüşse de daha sonra diğer etnik gruplarda yapılan çalışmalar M694V ile amiloidoz arasındaki ilişkiyi desteklemiştir. Diğer MEFV gen mutasyonlarını taşıyan hastalarda da amiloidoz gelişebilmektedir. Veriler yeterince güçlü olmamakla birlikte M694V homozigot AAA hastalarında muhtemelen artrit atağı riski de artmış olabilir<sup>12</sup>. M694V homozigotlarda hastalık erken yaşlarda başlamakta, daha sık atak ve daha fazla sayıda eklem tutulmakta ve yüksek doz kolşisin tedavisi gerekmektedir<sup>27</sup>. V726A mutasyonu ve diğer mutasyonlara sahip olan hastalarda da amiloidoz görülebilmektedir.

**2.1.7. Laboratuvar Testleri:** AAA için spesifik bir laboratuvar testi henüz mevcut değildir. Atak esnasında C-reaktif protein, fibrinojen ve serum amiloid A gibi akut faz reaktanlarının konsantrasyonu artmakla birlikte eritrosit sedimentasyon hızı ve lökosit sayısı da yükselmektedir. Bu bulguların tamamı ataklar arası dönemde (inaktif dönem) genellikle normal seviyelerdedir<sup>23</sup>. Akut atak döneminde interlökin-1 ve tümör nekroz faktör gibi inflamasyon mediatörlerinin salınımının artmasına karşın, interferon aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir<sup>39,40,41</sup>. Ayrıca akut atak döneminde eriyebilir interlökin-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerinin arttığı ve AAA'da sIL-2R'nin aktivite kriteri olabileceği ileri sürülmüştür<sup>42</sup>. Serozal sıvılarda C5a inhibitör aktivitesinde azalma

saptanmıştır<sup>34</sup>. İdrar analizi genellikle normaldir. Renal amiloidozlu AAA hastalarında proteinuri yükselebilir. Metaraminol provokasyon testi ve dopamin beta-hidroksilaz ölçümleri hasta açısından riskli ya da tanıya yardımcı olamadığından dolayı geniş kullanım alanı bulamamıştır<sup>27</sup>.

MEFV geninin klonlanması tanı amaçlı yeni ve kullanışlı moleküler testlerin gelişmesine imkan vermiştir. Bu testlerde hastalıktan sorumlu mutasyonların gösterilmesinde PCR primer setleri kullanılmaktadır. Bilinen 3 major mutasyon (M694V, M680I, V726A) AAA taşıyıcı kromozomlarının %85'inde mevcuttur<sup>4,5</sup>. Eğer bir populasyonda taşıyıcı gen frekansı 1:8 ise AAA hastalarının %98'i bu mutasyonlardan birini ya da her ikisini kalan %2'lik kısmının henüz bilinmeyen mutasyonları taşıyacağı, dolayısıyla %94'ü M694V mutasyonuna sahip olan Kuzey Afrikalı Yahudi AAA hastaları için bu testin oldukça hassas olduğu bildirilmiştir<sup>27</sup>.

## **2.2. MEFV Gen Mutasyonlarının Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Moleküler Yöntemler**

**2.2.1. ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction):** ARMS-PCR yöntemi genomik DNA'daki nokta mutasyonlar ve küçük delesyonlar veya insersiyonların tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır. 1989 yılında tanımlanmış olan bu yöntem, birbirini tamamlayan iki reaksiyon basamağında gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklarından biri mutasyona, diğeri normal diziye spesifik primerler içerdiği için bu yöntemle kişide mutasyon olup olmadığı ortaya konduğu gibi homozigot/heterozigot ayrımının yapılması da sağlanmaktadır<sup>43</sup>. ARMS-PCR yöntemi iki reaksiyon tüpünde gerçekleştirilmektedir. Tüplerden birinde (A tüpü) normal diziye, diğesinde ise (B tüpü) mutant diziye özgün primerler kullanılmaktadır. İkinci primerler ortaktır (common primer) ve her iki tüpe de konulur. Bu primerlerle bir mutasyon için iki ayrı tüpte (A ve B tüpleri) genomik DNA amplifikasyonu yapıldıktan sonra PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulanır. Amplifikasyon sadece A tüpünde gerçekleşmiş ise kişi araştırılan mutasyon yönünden normal, sadece B tüpünde gerçekleşmiş ise homozigot mutant, her iki tüpte de gerçekleşmiş ise heterozigottur (taşıyıcı) denir.

**2.2.2. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism):** PCR-RFLP moleküler yöntemi, MEFV geni mutasyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.<sup>44,45,46,47,48</sup> Bu yöntemle mutasyonun araştırılacağı gen bölgesinin belirli bir kısmı, mutasyonlu bölgeyi de içine alacak şekilde PCR tekniği ile çoğaltılır. Elde edilen belirli uzunluktaki genomik DNA parçası, araştırılacak mutasyona özgü olan restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilerek kesilir ve kesim ürünleri, DNA parçasının büyüklüğüne göre belirli bir konsantrasyondaki agaroz ya da poliakrilamid jelde elektroforez işlemine tabii tutulur ve jel etdyum bromid ile boyanıp UV ışıkta resimlenerek mutasyonun varlığına/yokluğuna karar verilir. Burada ilgili gen bölgesindeki bir nokta mutasyonu, ya restriksiyon enzimi tanıma bölgesi yaratarak amplifiye DNA'nın o noktadan kesilmesine veya bunun tersine restriksiyon enziminin kesim noktasının kaybına neden olur.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Araç ve Gereçler

#### 3.1.1. Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj (Jouan MR 18 12, Fransa)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Kubota, Japonya)
- Pastör fırını (Heraus, Almanya)
- pH metre (Hanna, Almanya)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- UV spektrofotometre (Shimadzu, Japonya)
- PCR cihazı (Thermal Cyclers, Biometra, Almanya)
- Elektroforez güç kaynağı (Pharmacia ECPS 3000/150, Norveç)
- Horizontal (yatay) elektroforez sistemi (EC 360M, ABD)
- Mini Vertikal (dikey) elektroforez sistemi (EC 120, ABD)
- UV transillumunator (Vilber Laurmat, Fransa)
- UV jel görüntüleme sistemi (UVIdoc, İngiltere)
- Hatplate (ısıtıcı tabla, Almanya)
- Otomatik pipetler (Scorex, Finnepette, Biohit)

#### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma)
- Acrilamid (Sigma)
- Bisacrilamid (Sigma)
- Amonyum persülfat (Sigma)
- Tetrametil etilen diamin, TEMED (Sigma)
- Tris-baz (Sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Hidroklorik asit, HCl (Sigma)

- Sodyum dodesil sülfat, SDS (Sigma)
- Cloroform (Sigma)
- Etil alkol (Sigma)
- İzoamil alkol (Sigma)
- Süktroz (Sigma)
- Sodyum hidroksit, NaOH (Sigma)
- Magnezyum klorür, MgCl<sub>2</sub> (Sigma)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- 10 X PCR tamponu (İontek ve Fermentaz)
- Taq DNA polimeraz enzimi (İontek ve Fermentaz)
- dNTPs ( dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Promega)
- PCR Primerleri (İontek ve Fermentaz)
- Restriksiyon enzimleri (Fermentaz)
- Proteinaz-K (Stratagene)
- Etidiyum bromid (Sigma)
- Krezol kırmızısı: “cresol red” (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)

### **3.2. Kan Örneklerinin Sağlanması**

Çalışmaya Ç.Ü. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı tarafından Tel Hashomer kriterlerine göre<sup>49</sup> ailevi Akdeniz ateşi hastalığı tanısı konmuş, aralarında akrabalık bulunmayan 50 hasta dahil edildi. Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kanlar hemen alt-üst edilerek pıhtılaşma önleni ve bu örnekler DNA eldesi için kullanıldı.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

##### 3.3.1.1. Stok Solüsyonlar

###### a) 1M MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O

- 10.16 g MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O
- 40 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 50 ml'ye tamamlandı
- Otoklavda steril edildi
- Oda ısısında saklandı

###### b) 6M NaCl

- 35.06 g NaCl
- 80 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı
- Otoklavda steril edildi
- Oda ısısında saklandı

###### c) 1M Tris-HCl, pH 7.5

- 12.11 g Tris-base
- 80 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- pH'lar HCl ile 7.5; 8.3; 8.6' ya ayarlandı
- Volümler bidistile H<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı
- Otoklavda steril edildi
- Oda ısısında saklandı



**d) 0.5M EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit), pH 8.0**

- 18.61 g disodyum EDTA
- 80 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- İçine 2 g NaOH tableti atarak eritildi
- PH 8 yapıldı (2 g NaOH pH'yı 8 yapmaya yeterli)
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı
- Otoklavda steril edildi
- Oda ısısında saklandı

**e) Krezol kırmızısı (cresol red)**

- 10 mg krezol kırmızısı
- 1 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Buzdolabında saklandı

**3.3.1.2. DNA Eldesi Solüsyonları**

**a) 5 X Red Cell Lysis Buffer ( Eritrosit lizis tamponu)**

- 54.8 g sükröz (final konsantrasyon 1.6 M)
- 5 ml Triton X-100 (final kons. %5 v/v)
- 2.5 ml 1M MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O (final kons. 25 mM)
- 6 ml 1M Tris-HCl, PH 7.5 (final kons. 60 mM)
- Sükröz 50 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Bidistile H<sub>2</sub>O Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> ve Tris-HCl ilave edildi
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı
- Buzdolabında muhafaza edildi.

**b) Proteinaz-K (20 mg/ml)**

- 100 mg proteinaz-K
- 5 ml bidistile H<sub>2</sub>O ilave edildi
- 0.5 ml'lik porsiyonlara ayrıldı
- -20 °C'de muhafaza edildi

**c) %10 SDS (sodyum dodesil sülfat)**

- 2 g SDS
- 16 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- bidistile H<sub>2</sub>O ile volüm 20 ml'ye tamamlandı
- Oda ısısında saklandı

**d) Krezol kırmızısı çalışma solüsyonu (elektroforez yükleme boyası)**

- 400 µl bidistile H<sub>2</sub>O
- 0.5 ml gliserol
- 100 µl, 10 mg/ml'lik krezol kırmızısı
- iyice vortexlenerek homojen hale getirildi
- Buzdolabında saklandı

**e) %70 Etil alkol**

- 70 ml %99.5 etil alkol'e
- 30 ml bidistile H<sub>2</sub>O eklendi
- -20 °C'de muhafaza edildi

**f) 24:1 Kloroform: İzoamil alkol**

- 24 ml kloroform + 1 ml izoamil alkol
- Buzdolabında muhafaza edildi

### 3.3.1.3. Elektroforetik Analiz Solüsyonları

#### a) 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu

- 108 g Tris-base (0.9M)
- 55 g Boric acid (0.9M)
- 40 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 (20 mM)
- Tris-base ve borik asit 700 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- EDTA eklendi
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı
- Oda ısısında, plastik bir şişe içinde muhafaza edildi

#### b) 0.5X TBE (çalışma solüsyon)

- 50 ml 10X TBE
- 950 ml bidistile H<sub>2</sub>O eklendi
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı

#### c) Etidiyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

- 0.1g etidiyum bromid
- 10 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Işık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi

#### d) %40 Akrilamid

- 39 g akrilamid
- 1 g N,N' metilen bisakrilamid
- 80 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı

**e) %25 Amonyum persülfat**

- 0.25 g Amonyum persülfat
- 0.5 ml bidistile H<sub>2</sub>O içinde çözüldü
- Volüm bidistile H<sub>2</sub>O ile 1 ml'ye tamamlandı
- Buzdolabında saklandı
- 2 hafta kullanıldıktan sonra atıldı

**3.3.2. DNA Eldesi**

DNA eldesi için Miller et al.<sup>50</sup> in salting out (tuz çöktürme) yöntemi modifiye edilerek uygulandı.

- 1- 10 ml'lik steril bir tüpe 1ml 5X lizis tamponu, üzerine 3 ml bidistile H<sub>2</sub>O konup pipetle homojen hale getirildikten sonra bu karışıma 1ml EDTA'lı tam kan ilave edilerek tüpün kapağı kapatıldı ve tüp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı.
- 2- Buz içinde 10 dk inkübe edildi.
- 3- +4 °C'de 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı.
- 4- Dipte kalan çökelti üzerine 2 ml bidistile H<sub>2</sub>O ve 0.5 ml 5X lizis tamponu konulup, pipetleme yapılarak tüpün dibindeki çökelti tamamen dağıtılarak homojen hale getirildi.
- 5- +4 °C'de 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı.
- 6- Çökelti üzerine 1 ml %10 SDS ve 20 mg/ml'lik proteinaz-K'dan 2.5 µl konulup köpük oluşturmada iyice pipetleme yapılarak çökelti tamamen dağıtıldı.
- 7- 65 °C ye ayarlı etüvde, arada bir hafifçe karıştırarak 15 dk inkübe edildi.
- 8- Karışım 10 ml'lik tüpten 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılarak buz içinde 5 dk inkübe edildi.
- 9- Bu süre sonunda 300 µl sature (6 N) NaCl ilave ettikten sonra tüp bir vorteks yardımıyla iyice çalkalanarak beyaz görünümlü içerik homojen hale getirildi.
- 10- Buz içinde 5 dk bekletildi.
- 11- +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- 12- Üst sıvı 2 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarıldı.

- 13- Bu tüpe 0.5 ml, 24:1 kloroform/izoamil alkol karışımı kondu ve tüp iyice çalkalanarak karışım homojen hale getirildi.
- 14- +4 °C'de 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- 15- Üst sıvı dikkatli bir şekilde 2 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 16- Tüpe 1 ml %99.5'lik etil alkol konularak tüp 8-10 kez yavaşça baş-aşağı çevrilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Bu aşmada DNA yumak şeklinde görüldü.
- 17- +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek presipite olmuş DNA çöktürüldü.
- 18- Tüp ters çevrilerek alkol uzaklaştırıldı.
- 19- Tüpe 1 ml %70 etil alkol konulup, tüp alt-üst edildi.
- 20- +4 °C'de 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra tüp ters çevrilerek alkol uzaklaştırıldı ve tüpün ağzı baş aşağı gelecek şekilde bir kurutma kağıdı üzerine konularak alkolün tamamen uzaklaşması için 15 dk bekletildi.
- 21- Tüpe 200 µl steril bidistile H<sub>2</sub>O konuldu ve DNA'nın tamamen çözünmesi ve DNaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 75 °C'de 10 dk bekletildi.

### 3.3.2.1. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Konsantrasyon ölçümü için 1 ml hacimli iki adet quartz tüp alındı. Bunlardan blank olarak kullanılacak olan 1. tüpe 1000 µl, ikinci tüpe ise 990 µl steril bidistile H<sub>2</sub>O konuldu. İkinci tüpe elde edilen genomik DNA'dan 10 µl konulup iyice pipetlenerek homojen hale getirildi. Her iki tüp spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ayrı ayrı okunduktan sonra DNA konsantrasyonu ve DNA'nın saflığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu = Absorbans (ABS)<sub>260</sub> X Sulandırma katsayısı X 50/1000

Örneğin ABS'in 0.09 okunduğunu farzedelim. Bu durumda konsantrasyon şöyle olacaktır:

DNA Konsantrasyonu = 0.09 X 100 X 50/1000 = 0.45 µg/µl (450 ng/µl)

Elde edilen DNA'nın saflığı ise şu şekilde bulunur: ABS<sub>260</sub> / ABS<sub>280</sub>

ABS<sub>260</sub> / ABS<sub>280</sub> = 1.8- 2.0 aralığında olmalıdır. Bu oran 2.0'ın üzerindeyse RNA, 1.8'in altındaysa protein fazlalığı var demektir. Bu oran 1.5'in altındaysa protein fazlalığından ötürü PCR çalışmasında problemler ortaya çıkabilir.

Yukarıda izah edildiği şekilde ölçtüğümüz DNA'ların konsantrasyonları 0.05 µg/µl (50 ng/µl) olacak şekilde ayarlandıktan sonra 3 ependorf tüpe bölünerek, çalışma gününe kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.3.3. MEFV Geninin 10. Ekzonunda Meydana Gelen M694V, M694I, M680I ve V726A Mutasyonlarının ARMS Tekniği ile Saptanmasında Kullanılan Primer Dizileri**

M694V, M680I ve V726A mutasyonlarının tespiti için gerekli primer dizileri Eisenberg et al.<sup>51</sup>'in, M694I primerleri ise Medlej-Hashim, et al.<sup>45</sup>'in yaptıkları çalışmalarda kullandıkları primerlerden seçilmiştir. M680I ve V726A mutasyonlarının PCR-RFLP ile belirlenmesinde kullanılan primerler aynı zamanda ARMS'da internal kontrol primerleri olarak kullanılmıştır. ARMS'da kullanılan bütün primerler HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) pürifikasyonu ile birlikte Iontek firmasına (Bursa, Türkiye) yaptırılmıştır. Eisenberg et al.<sup>51</sup> M694V, M680I ve V726A mutasyonlarını belirlemek için kullandıkları normal ve mutant primerleri belirlerlerken, spesifiteyi artırmak için her iki primerin 3' ucundaki son nükleotidden bir önceki nükleotidi genomik DNA ile hibridize olmayacak şekilde değiştirmişlerdir. Böylece genomik DNA'da normal primerin mutasyonlu, mutant primerin ise normal diziyile hibridizasyonunu tamamen ekarte etmişlerdir.

---

**Çizelge 3.1. M694V, M694I, M680I ve V726A ARMS ve internal kontrol primer dizileri**

---

**M694V primerleri**

**Common:** 5'-TGA CAG CTG TAT CAT TGT TCT GGG CTC TCC G-3'

**Normal :** 5'-TCG GGG GAA CGC TGG ACG CCT GGT ACT CAT TTT CCT TCC T-3'

**Mutant :** 5'-TCG GGG GAA CGC TGG ACG CCT GGT ACT CAT TTT CCT TCC C-3'

**M694I primerleri**

**Common:** 5'-TAT CAT TGT TCT GGG CTC-3'

**Normal :** 5'-CTG GTA CTC ATT TTC CTT C-3'

**Mutant :** 5'-CTG GTA CTC ATT TTC CTT T-3'

**M680I primerleri**

**Common:** 5'-TTA GAC TTG GAA ACA AGT GGG AGA GGC TGC-3'

**Normal :** 5'-ATT ATC ACC ACC CAG TAG CCA TTC TCT GGC GAC AGA GCC-3'

**Mutant :** 5'-ATT ATC ACC ACC CAG TAG CCA TTC TCT GGC GAC AGA GCG-3'

**V726A primerleri**

**Common:** 5'-TGG AGG TTG GAG ACA AGA CAG CAT GGA TCC-3'

**Normal :** 5'-TGG GAT CTG GCT GTC ACA TTG TAA AAG GAG ATG CTT CCT A-3'

**Mutant :** 5'-TGG GAT CTG GCT GTC ACA TTG TAA AAG GAG ATG CTT CCT G-3'

**İnternal kontrol primer çifti**

**Forward :** 5'-TGT ATC ATT GTT CTG GGC TCT-3'

**Reverse :** 5'-AGG GCT GAA GAT AGG TTG AA-3'

---

**3.3.3.1. ARMS Yöntemi ile MEFV Geni 10. Ekzon Mutasyonlarının (M694V, M694I, M680I, V726A) Belirlenmesi.**

Yukarıda verilen ARMS primerleri ve elde edilen genomik DNA kullanılarak, incelenen 4 mutasyon için optimum reaksiyon karışımları ve konsantrasyonları Çizelge 3.2'de, amplifikasyon sıcaklıkları ise Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Optimum amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
PCR tamponu (10 X)	1	1X
Krezol kırmızısı yükleme tamponu (%50 glyserol + 100 µg/ml krezol kırmızısı)	1	0.1 µg krezol kırmızısı, %5 gliserol
Common primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Normal/Mutant primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Internal kontrol primer1 (5 pmol/µl)	0.5	2.5 pmol
Internal kontrol primer2 (5 pmol/µl)	0.5	2.5 pmol
Deoksi NTPs (12.5 mM)	0.16	0.2 mM
Genomik DNA (50 ng/µl)	1	50 ng
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2	1 U
Steril bidistile su	3.64	
<b>Total Hacim</b>	<b>10 µl</b>	

Çizelge 3.3. M694V, M680I ve V726A mutasyonları için uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri (PCR programı)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
ilk (Initial) denatürasyon	94	9 dk	1
Denatürasyon	94	10 sn.	35
Primer bağlanması (Annealing)	60	10 sn.	
Zincir uzaması (Extension)	72	30 sn.	
Son uzatma (Final extension)	72	10 dk	1

Çizelge 3.4. M694I mutasyonu için uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
İlk (Initial) denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	35
Primer bağlanması (Annealing)	60	1 dk	
Zincir uzaması (Extension)	72	2 dk	
Son uzatma (Final extension)	72	7 dk	1



### 3.3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi Maniatis et al.<sup>52</sup>'in yöntemine göre yapıldı.

- 1- 0.9 g agaroz tartılarak 100 ml'lik bir Erlenmayere kondu ve 60 ml 0.5X TBE tamponu eklendi (%1.5'lik agaroz) ve 10 mg/ml'lik etidiyum bromid'den 4 µl ilave edildi.
- 2- Isıtıcı (hotplate) üzerinde kaynatıldı.
- 3- Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
- 4- Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına döküldü ve donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
- 5- Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.
- 6- Jeldeki açılmış olan kuyucuklara 10'ar µl miktarlarda sırasıyla DNA marker (pUC18/Hae III) ve PCR ürünleri applike edildi.
- 7- Jele elektrik akımı (15Volt/cm) verilerek 15 dk elektroforez yapıldı.
- 8- Oluşan bantlar UV altında okunarak (UVIdoc, UK) bir diskete alındı.

### 3.3.4. MEFV Geninin 10. Ekzonunda Meydana Gelen M694V, M694I, M680I ve V726A Mutasyonlarının PCR-RFLP Tekniği ile Saptanmasında Kullanılan Primer Dizileri

PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile M694V ve M694I mutasyonlarının tespiti için Gersoni-Baruch et al.<sup>48</sup>, M680I ve V726A mutasyonlarının belirlenmesinde ise Ben-Chetrit et al.<sup>47</sup>'in çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir. Bu primer dizileri HPLC pürifikasyonu ile birlikte TIB-MOLBIOL (Berlin, Almanya) firmasına yaptırılmıştır.

Çizelge 3.5. M694V, M694I, M680I ve V726A PCR-RFLP primerleri

**M694V mutasyonunu belirlemek için kullanılan primer çifti**

**Forward primer:** 5'-GAA TGG CTA CTG GGT GGA GAT-3'

**Reverse primer :** 5'-TGT CAC ATT GTA AAA GGA G-3'

**M694I mutasyonunu belirlemek için kullanılan primer çifti**

**Forward primer:** 5'-GCT ACT GGG TGG TGA TAA TCA T-3'

**Reverse primer :** 5'- TGT CAC ATT GTA AAA GGA G-3'

**M680I ve V726A mutasyonlarını belirlemek için kullanılan primer çifti**

**Forward primer:** 5'-TGT ATC ATT GTT CTG GGC TCT-3'

**Reverse primer :** 5'-AGG GCT GAA GAT AGG TTG AA-3'

**3.3.4.1. PCR-RFLP Yöntemi ile MEFV Geni 10. Ekzon Mutasyonlarının (M694V, M694I, M680I, V726A) Belirlenmesi**

Yukarıda verilen PCR primerleri ve elde edilen genomik DNA kullanılarak, incelenen 4 mutasyon için optimum reaksiyon karışımları ve konsantrasyonları Çizelge 3.6'da, amplifikasyon sıcaklıkları ise Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonları için optimum amplifikasyonun gerçekleştiği reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X PCR tamponu	1	1X
Forward primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Reverse primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Deoksi NTPs (12.5 mM)	0.16	0.2 mM
Genomik DNA (50 ng/µl)	1	50 ng
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.2	1 U
Steril bidistile su	5.64	
<b>Total Hacim</b>	<b>10 µl</b>	

**Not:** M680I ve V726A mutasyonları için PCR amplifikasyonu tek tüpte yapıldı ve dolayısıyla total hacim 20 µl olarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon tüpünde hazırlanan bu karışım Çizelge 3.7’de verilen değerlere göre programlanıp PCR cihazına yerleştirilerek amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonları için PCRprogramı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
İlk (Initial) denatürasyon)	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn.	35
Primer bağlanması (Annealing)	61	30 sn.	
Zincir uzaması (Extension)	72	1 dk	
Son uzatma (Final extension)	72	10 dk	1

### 3.3.4.2. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi

M694V mutasyonun belirlenmesi için HphI, M694I için BspHI, M680I için HinfI ve V726A mutasyonu için ise AluI restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Bu enzimlerin optimum aktivasyon gösterdiği tamponlar ise sırasıyla HphI için B tamponu [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL BSA], BspHI için O tamponu [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA], HinfI için R tamponu [10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA] ve AluI enzimi için ise Y/Tanço [33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/ml BSA] tamponudur. Kesim reaksiyonu Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının kesim reaksiyonu karışımı

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Amplifiye ürün (PCR ürünü)	10
Steril bidistile su	3
10X tampon	1.5
Restriksiyon enzimi(10 U/µl)	0.5

Her bir mutasyon için ayrı ayrı hazırlanan kesim reaksiyonu karışımı 37°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra elde edilen 15 µl'lik kesim ürünü üzerine 3 µl 5X loading dye (bromfenol blue) ilave edilip, bunun 5 µl'si kullanılarak poliakrilamid jel elektroforezi işlemi uygulandı.

M680I ve V726A mutasyonlarını heterozigot halde bulunduran 2 hastada, bu iki mutasyonun aynı (*cis*) ya da karşılıklı allellerde (*trans*) olup olmadığını göstermek için PCR ürünü hem M680I hem de V726A mutasyonları için kullanılan iki farklı restriksiyon enzimiyle (HinfI ve AluI) aynı tüpte kesim işlemine maruz bırakıldı. Bu reaksiyon karışımı çizelge 3.9'da verilmiştir.

**Çizelge 3.9.** M680I ve V726A heterozigot mutasyonlarını birlikte bulunduran hastaların PCR ürünlerinin HinfI ve AluI enzimleriyle aynı tüpteki kesim reaksiyonu karışımı

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Amplifiye ürün (PCR ürünü)	10
Steril bidistile su	1.5
10X Y/Tanço tamponu	1.5
HinfI restriksiyon enzimi (10 U/µl)	1
AluI restriksiyon enzimi (10 U/µl)	1

Bu karışım 37°C'de 8 saat inkübe edildikten sonra poliakrilamid jel elektroforezi işlemi uygulandı. M694V ve M694I mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan primer dizileri ve dolayısıyla elde edilen PCR ürünleri farklı olduğu için M680I/V726A heterozigotları dışında kalan M694V/M694I, M694V/M680I, M694V/V726A ve M694I/M680I mutasyonlarını birlikte bulunduran heterozigot hastalara yukarıdaki işlem uygulanamamıştır.

### 3.3.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi için Maniatis et al.<sup>52</sup>'in yöntemi modifiye edilerek uygulandı.

1- %12'lik poliakrilamid jeli aşağıdaki şekilde hazırlandı

%40 akrilamid stok	1.5 ml
Bidistile H <sub>2</sub> O	3 ml
10X TBE	0.5 ml
%25 Amonyum persülfat	33 µl
TEMED	1.5 µl

- 2- İki cam arasına ve arada 1 mm boşluk kalacak şekilde hazırlanan vertikal mini-elektroforez jel dökme kabına, yaklaşık 4.5 ml kadar jel kondu ve tarak yerleştirilerek akrilamid polimerizasyonu (jelin katılaşması) için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
- 3- Tarak çıkartıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirilerek tarak dişlerinin açmış olduğu kuyucuklara 5'er µl miktarlarda pUC18 DNA/Msp1 markeri ve aynı miktarlarda kesim ürünleri uygulandı.
- 4- 15 Volt /cm<sup>2</sup> olacak şekilde elektrik akımı verilerek 60 dakika süreyle elektroforez yapıldı. Jel iki cam arasından çıkartılıp içinde 0.5 µg/ml etidiyum bromide bulunan TBE tamponu içinde 15 dk bekletilerek DNA fragmanlarının boyanması sağlandı.
- 6- Bantlar UV altında okunarak görüntü diskete kaydedildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya aldığımız 33'ü kadın ve 17'si erkek toplam 50 AAA hastasının yaş ortalaması  $32.6 \pm 10.1$  olup isim, yaş ve cinsiyetleri aşağıda (Çizelge 4.1) verilmiştir.

Çizelge 4.1. AAA hastalarının isim, yaş ve cinsiyetleri

No	İsim	Yaş	Cinsiyet
01	A.İ.	32	K
02	Ö.U.	47	E
03	G.C.	19	K
04	Y.M.	16	E
05	F.K.	36	K
06	S.G.	27	K
07	D.D.	34	K
08	Ş.Y.	46	K
09	M.M.	58	E
10	O.A.	25	E
11	S.Y.	40	K
12	N.C.	21	K
13	F.K.	27	K
14	A.Y.	38	E
15	Ö.Ü.	34	E
16	F.D.	38	K
17	F.S.	28	K
18	S.B.	13	K
19	Ç.K.	22	E
20	T.E.	48	K
21	K.D.	39	K
22	E.E.	24	K
23	E.S.	40	K
24	H.B.	34	K
25	İ.U.	20	K
26	L.K.	24	K
27	M.A.Ç.	42	E
28	M.Ş.	42	E
29	M.D.	33	E
30	O.K.	26	E

Çizelge 4.1(devam). AAA hastalarının isim, yaş ve cinsiyetleri

No	İsim	Yaş	Cinsiyet
31	M.D.	30	K
32	G.İ.	34	K
33	S.B.	40	K
34	N.K.	48	K
35	Z.E.	39	K
36	M.Ü.	19	K
37	M.Ö.	18	K
38	M.K.	32	E
39	A.O.	32	K
40	T.K.	48	K
41	L.Y.	41	K
42	D.K.	24	K
43	M.E.	39	K
44	S.Z.	31	E
45	S.A.	30	E
46	B.İ.	36	E
47	S.Ç.	28	E
48	S.T.	47	K
49	M.B.	17	K
50	M.A.	26	E

Çalışılan 50 AAA hastasının doğum yerleri ile bazı klinik özellikleri sırasıyla Çizelge 4.2 ve 4.3’de, ayrıca genotipik özelliklerle hastalık başlangıç ve tanı yaşı ile aile öyküsü Çizelge 4.4’de, hastaların genotipik özellikleri ile bazı klinik özelliklerinin karşılaştırılması ise Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. AAA hastalarının doğum yerleri

Şehir	Hasta Sayısı	%
Adana	20	40
Kahramanmaraş	7	14
Hatay	5	10
Adıyaman	3	6
Gaziantep	3	6
Osmaniye	2	4
Ağrı	2	4
İçel	1	2
Aydın	1	2
Malatya	1	2
Şanlıurfa	1	2
Elazığ	1	2
Siirt	1	2
Erzurum	1	2
Bingöl	1	2

Çizelge 4.3. AAA hastalarının bazı fenotipik özellikleri

Kadın/Erkek	33/17
Hastalık başlangıç yaşı (yıl±SD)	14.4±9.4
Tanı yaşı	23.3±9.2
Ateş	%94
Karın ağrısı	%90
Göğüs ağrısı	%44
Artrit	%50
Amiloidoz	%2
Proteinüri	%6
Ailede AAA varlığı	%36



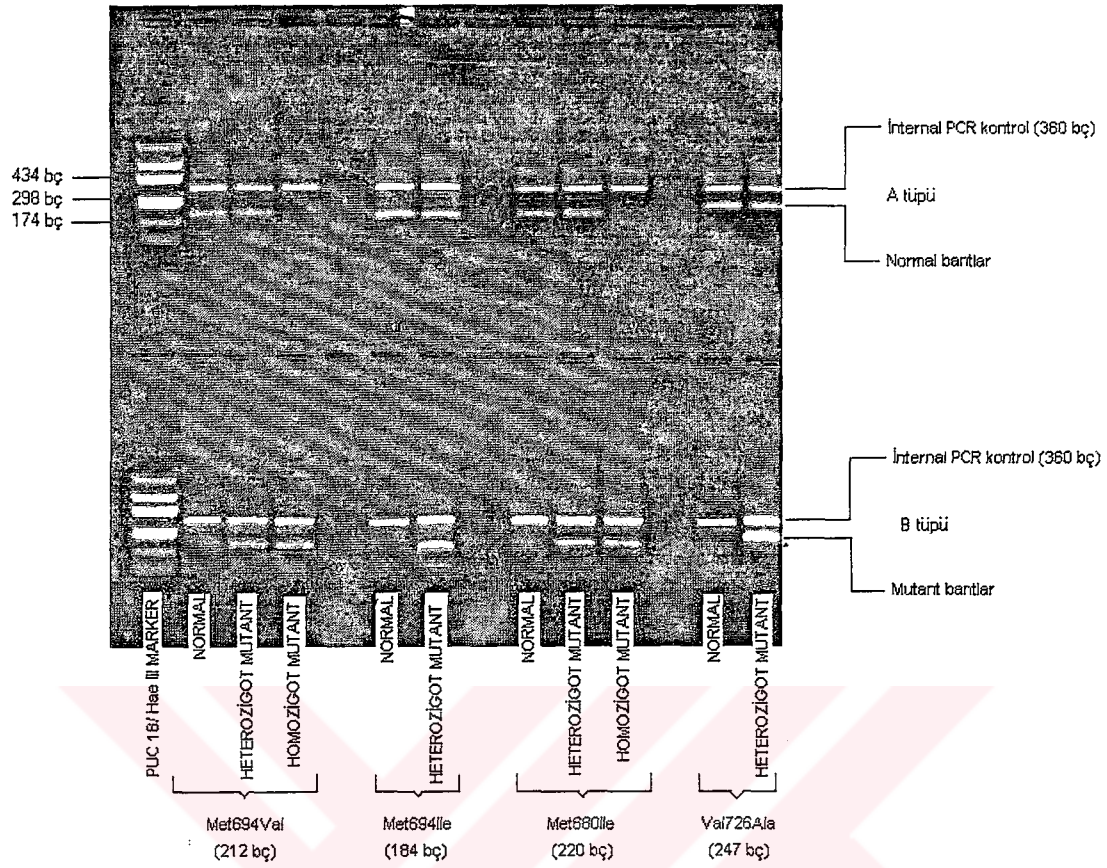
**Çizelge 4.4.** AAA hastalarında genotipik özelliklerin hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı ve aile öyküsü ile karşılaştırılması

Genotip	Sayı	Cinsiyet (K/E)	Hast.Başlangıç Yaşı Ortalaması	Tanı Yaşı Ortalaması	Ailede AAA Varlığı
M694V/M694V	9	5/4	10.5	18.9	3/9
M694V/M694I	1	1/0	7	7	0/1
M694V/M680I	8	6/2	8	24.2	4/8
M694V/V726A	6	2/4	20.2	23.3	2/6
M694I/M680I	1	1/0	10	31	0/1
M680I/M680I	4	3/1	8.3	27.3	2/4
M680I/V726A	2	2/0	15.5	32	0/2
M694V/?	10	6/4	19.8	24.6	4/10
M694I/?	1	1/0	?	?	1/1
M680I/?	1	1/0	10	25	0/1
V726A/?	1	1/0	2	27	1/1
Bilinmiyor	6	4/2	15.2	22.8	1/6

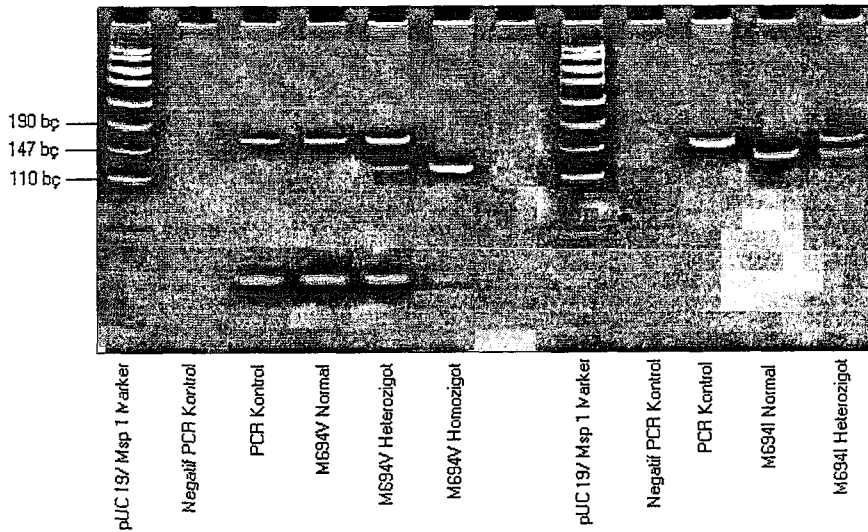
**Çizelge 4.5.** AAA hastalarında genotipik özelliklerin bazı klinik özelliklerle karşılaştırılması

Genotip	Sayı	Ateş	Karın Ağrısı	Göğüs Ağrısı	Artrit	Proteinüri	Amiloidoz
M694V/M694V	9	9/9	9/9	5/9	7/9	2/9	0/9
M694V/M694I	1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
M694V/M680I	8	8/8	5/8	4/8	4/8	1/8	1/8
M694V/V726A	6	6/6	6/6	2/6	2/6	0/6	0/6
M694I/M680I	1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
M680I/M680I	4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4
M680I/V726A	2	2/2	2/2	0/2	1/2	0/2	0/2
M694V/?	10	8/10	8/10	4/10	3/10	0/10	0/10
M694I/?	1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
M680I/?	1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
V726A/?	1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Bilinmiyor	6	6/6	6/6	2/6	4/6	0/6	0/6

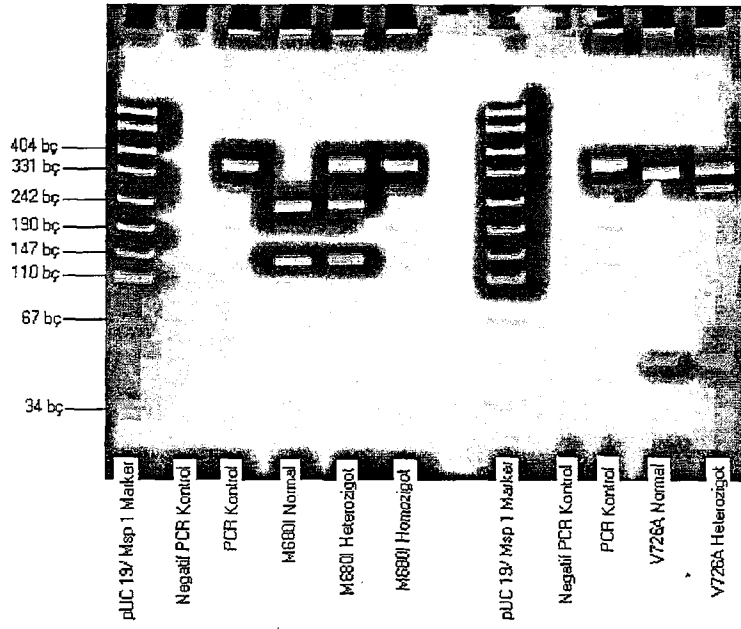
Bazı hastalara ait M694V, M694I, M680I ve V726 mutasyonlarının ARMS-PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1’de, PCR-RFLP poliakrilamid jel elektroforez görüntüleri ise Şekil 4.2’ ve 4.3’de verilmiştir. M680I ve V726A heterozigot mutasyonlarını birlikte taşıyan iki hastaya ait PCR ürünlerinin aynı tüpte Hinfl ve AluI enzimleriyle muamele edilerek elde edilen poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü ise Şekil 4.4’de görülmektedir.



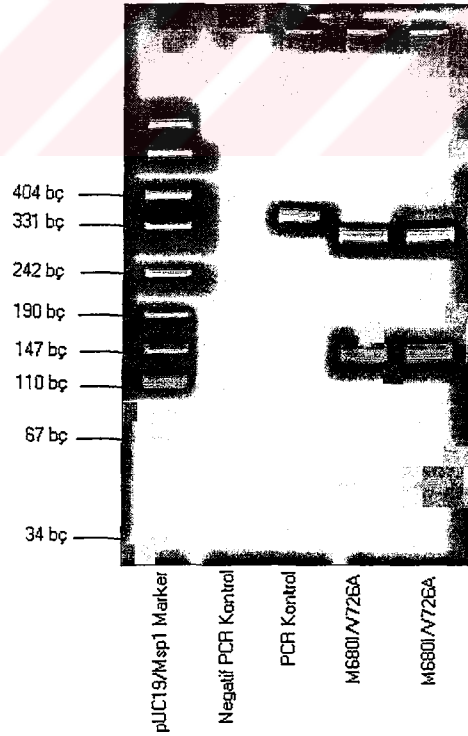
Şekil 4.1. ARMS-PCR yöntemiyle belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının %1.5 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.2. PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen M694V ve M694I mutasyonlarının %12 poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (M694V pozitif PCR kontrol: 154 bç, M694V normal: 154 bç, M694V heterozigot: 154-118-36 bç, M694V homozigot mutant: 118-36 bç; M694I pozitif PCR kontrol: 149 bç, M694I normal: 130-19 bç, M694I heterozigot: 149-130-19 bç)



Şekil 4.3. PCR-RFLP tekniği ile belirlenen M680I ve V726A mutasyonlarının %12 poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (PCR Kontrol: 360 bç; M680I Normal: 234-126 bç; M680I Heterozigot: 360-234-126 bç; M680I Homozigot: 360 bç; V726A Normal: 320-40 bç; V726 Heterozigot: 320-262-58-40 bç).



Şekil 4.4: M680I ve V726 heterozigot iki hastaya ait PCR ürünlerinin aynı tüpte Hinfl ve AluI enzimleriyle kesilmiş DNA fragmanlarının poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (PCR Kontrol: 360 bç; M680I/V726: 320-136-126-58-40 bç)

Yaptığımız mutasyon analizlerinde 50 hastanın 100 bağımsız MEFV allelinin 75'inde (%75) mutasyon bulunmuştur (Tablo 4.6). Çalışılan 4 tip mutasyon göz önüne alındığında hastalarımızın 12 farklı genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Elli hasta içinde aynı mutasyon tipini her iki allele de bulunduran (homozigot) hasta sayısı 13 (%26), mutasyonların farklı kombinasyonlarını birleşik heterozigot halde bulunduran hasta sayısı 18 (%36), allelin birisi bilinmeyen heterozigot hasta sayısı ise 13 (%26) olarak belirlendi. Altı hastada (%12) ise çalışılan 4 mutasyondan hiçbiri saptanamadı. Çalışmamızda en sık görülen mutasyon M694V olup, bağımsız allellerin %43'ünde, M694I %3'ünde, M680I %20'sinde ve V726A %9'unda saptanmıştır (Tablo 4.7).

**Çizelge 4.6.** M694V, M694I, M680I ve V726A MEFV gen mutasyonlarının 50 AAA hastasındaki (100 allel) sıklığı

Mutasyon	Allel sayısı	Sıklık (%)
M694V	43	43
M694I	3	3
M680I	20	20
V726A	9	9
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>75</b>

**Çizelge 4.7.** AAA hastalarında M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının dağılımı

Mutasyon	Hasta Sayısı	%
M694V / M694V	9	18
M694V / M694I	1	2
M694V / M680I	8	16
M694V / V726A	6	12
M694I / M680I	1	2
M680I / M680I	4	8
M680I / V726A	2	4
M694V /?	10	20
M694I/?	1	2
M680I /?	1	2
V726A /?	1	2
Bilinmiyor	6	12

Çalışmamızda ARMS ve PCR-RFLP moleküler yöntemleriyle belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının analiz süreleri Çizelge 4.8 ve 4.9'da, maliyet hesaplamaları ise Çizelge 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** ARMS yöntemi ile belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının analiz süreleri

Mutasyon	DNA İzolasyonu	PCR	Elektroforez	Toplam Süre
M694V M680I V726A	2 saat	1 saat 23 dakika	15 dakika	3 saat 38 dakika
M694I	2 saat	3 saat 10 dakika	15 dakika	5 saat 25 dakika

**Çizelge 4.9.** PCR-RFLP yöntemi ile belirlenen M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının analiz süreleri

Mutasyon	DNA İzolasyonu	PCR	Kesim Reaksiyonu	Elektroforez Ve Boyama	Toplam Süre
M694V M680I V726A M694I	2 saat	2 saat	1 saat	1 saat 15 dakika	6 saat 15 dakika

**Çizelge 4.10.** ARMS yöntemi ile M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının ABD Doları cinsinden maliyeti

Mutasyon	PCR Amplifikasyonu	Agaroz Jel Elektroforezi	DNA İzolasyonu*	Diğer	Genel Toplam
M694V	1.83	0.1	2	0.5	
M694I	1.62	0.1	2	0.5	
M680I	1.82	0.1	2	0.5	
V726A	1.82	0.1	2	0.5	
<b>Total</b>	<b>7.09</b>	<b>0.4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>11.49</b>

\*Dört tip mutasyon analizi için aynı hastadan izole edilen DNA molekülü yeterli olduğundan tek bir test veya 4 testin total maliyeti 2 ABD Doları olmaktadır.



**Çizelge 4.11.** PCR-RFLP yöntemi ile M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının ABD Doları cinsinden maliyeti

<b>Mutasyon</b>	<b>PCR Amplifikasyonu</b>	<b>RE Kesimi</b>	<b>Poliakrilamid Jel Elektroforezi</b>	<b>DNA İzolasyonu*</b>	<b>Diğer</b>	<b>Genel Toplam</b>
M694V	1.42	2.35	0.05	2	0.5	
M694I	1.42	1.25	0.05	2	0.5	
M680I	1.42	0.24	0.05	2	0.5	
V726A	1.42	0.87	0.05	2	0.5	
<b>Total</b>	<b>5.68</b>	<b>4.72</b>	<b>0.2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>14.6</b>

\*Dört tip mutasyon analizi için aynı hastadan izole edilen DNA molekülü yeterli olduğundan al tek bir test veya 4 testin total maliyeti 2 ABD Doları olmaktadır.

Maliyet hesaplamaları yapılırken ticari firmalardan gelen tekliflerin ortalama fiyatları baz alınmıştır. Kullanılan primerlerin maliyetleri hesaplanırken, primerleri oluşturan herbir nükleotidin fiyatı 3 ABD Doları ve herbir primer çiftiyle 500 test yapılabileceği göz önüne alınmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Türk toplumu genetik olarak AAA hastalığı gelişimine eğilimli olan dört etnik gruptan (Türk, Yahudi, Ermeni ve Arap) birisi olup taşıyıcı frekansı 1/5'dir.<sup>31</sup> AAA hastalarında belirlenmiş olan en yaygın mutasyonlar M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarıdır. M694V mutasyonu Türklere<sup>31,53,54</sup> ve non-Aşkenaz Yahudilerde<sup>4,5,55</sup> en sık görülen nokta mutasyonudur. M694V mutasyonu sıklığını Yılmaz et al.<sup>31</sup> bağımsız allellerin %51.55'inde, Yalçinkaya et al.<sup>53</sup> %41'inde, Akar et al.<sup>54</sup> ise %43.5'inde saptamışlardır. Çalışmamızda M694V nokta mutasyonu sıklığı bağımsız allellerin %43'ünde belirlenmiştir. M694I mutasyonu gerek Türk AAA hastalarında gerekse bu hastalığın yaygın olarak görüldüğü diğer toplumlardaki AAA hastalarında nadir olarak görülmektedir.<sup>4,31,54,56</sup> M694I mutasyonu sıklığını Yılmaz et al.<sup>31</sup> %0.44, Yalçinkaya et al.<sup>53</sup> %17 ve Akar et al.<sup>54</sup> ise %2.8 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise M694I mutasyonu bağımsız allellerin %3'ünde saptanmıştır. M680I mutasyonu hastalarımızda MEFV bağımsız allellerinin %20'sinde, V726A mutasyonu %9'unda saptanmıştır. M680I ve V726A mutasyonları sıklığını sırasıyla Yılmaz et al.<sup>31</sup> %9.22 ve %2.88 Yalçinkaya et al.<sup>53</sup> %16 ve %14 ve Akar et al.<sup>54</sup> %12 ve %11.1 olarak saptamışlardır. Bu sonuçlar dikkate alındığında, hastalarımızdaki bu dört majör nokta mutasyonlarının sıklığı genel olarak Akar et al.<sup>54</sup>'in sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Yine bulduğumuz M694V, M680I ve V726A mutasyonlarının sıklığı Yalçinkaya et al.<sup>53</sup>'in oranları ile uyumlu olmakla birlikte, M694I mutasyonu sıklığı farklılık göstermektedir. M694I mutasyonu için bulduğumuz %3'lük oran literatür bilgileriyle uyumludur.<sup>31,45,54</sup> Bu mutasyon için Yalçinkaya et al.<sup>53</sup>'in buldukları %17'lik sıklık sonuçlarımıza göre oldukça yüksektir. Aynı araştırma grubunun yaptığı diğer çalışmada aynı mutasyon için bu sıklık %2.8 olarak belirtilmiştir.<sup>54</sup> Bulgularımız Yılmaz et al.<sup>31</sup>'in sonuçlarıyla kıyaslandığında bu dört mutasyonun sıklığı sonuçlarımıza göre düşüktür. Bu sonuçlar arasındaki farklılıklar, çalışmalara dahil edilen hasta sayılarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi mutasyonların belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden de kaynaklanabilir. Bu konuda kesin sonuca ulaşabilmek için Türkiye'deki diğer coğrafik bölgelerde de çalışmaların yapılması gerektiği önerilmektedir.<sup>31</sup>

Yapılan çalışmalarda AAA hastalarındaki M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonlarının toplam sıklığı %60-95 arasında değişmektedir.<sup>4,5,31,44,53,57</sup> Çalışmamızda ise bu dört mutasyonun sıklığı ele alındığında, hastalarımızın %88'i bu MEFV gen mutasyonlarını homozigot, heterozigot ya da birleşik heterozigot şeklinde bulundurmaktadırlar. Hastalarımızın %12'sinde ise çalışılan dört mutasyondan hiçbirisi bulunamamıştır. Hastalarımızda bu dört mutasyon dışında, bugün için bilinen ancak çalışmadığımız diğer MEFV gen mutasyonlarının bulunabileceği gibi, MEFV gen bölgesi dışında başka bir genomik bölgede hastalığının ortaya çıkmasına neden olabilecek genetik defektlerin bulunabileceğini düşünmekteyiz.

AAA hastalığının tanısında kullanılacak belirli bir laboratuvar testi henüz yoktur. Günümüzde AAA tanısı klinik belirti (karın-göğüs ağrısı, ateş vs), etnik köken, aile hikayesi ve kolşisine cevap gibi tamamen klinik verilere göre konulmaktadır<sup>58</sup>. MEFV geninin klonlanmasıyla, hastalığın moleküler teşhisi için DNA dizi analizi, DGGE, ARMS ve PCR-RFLP gibi moleküler testler geliştirilmiştir. Bu testlerle M694V, M694I, M680I ve V726A mutasyonları belirlenerek AAA hastalarının büyük bir çoğunluğuna moleküler tanı koymak mümkün olabilmektedir<sup>4,5,31,53,54,57</sup>. Bulgularımıza göre hastalarımızın %62'si bu dört majör mutasyon yönünden homozigot ya da birleşik heterozigot mutant olduğundan dolayı bölgemizdeki AAA hastalarının %62'sine moleküler tanı koymanın mümkün olduğu söylenebilir. Bu moleküler testler, hastalığın kesin tanısı yanında, atipik klinik belirtileri olan hastaların tanısının konulmasında da oldukça yararlıdır<sup>57</sup>. Bu moleküler testler yardımı ile MEFV mutasyonlarının sık görüldüğü toplumlarda, ailelerinde AAA hastaları bulunan fakat bu mutasyonlara sahip olduğu halde semptom vermeyen aile üyeleri belirlenip takibe alınabilir. Özetle etkin, non-invaziv ve oldukça sensitiv olan ARMS ve PCR-RFLP, AAA hastalığının doğru tanısında ya da klinik teşhisin doğrulanmasında oldukça önemli ve güvenilir tekniklerdir. Bu teknikler, AAA hastalarının klinik tedavilerinin düzenlenmesi, hasta ve aileye tıbbi ve genetik danışmanlık hizmetinin verilebilmesi açısından da önemli olabilir.

Hem ARMS hem de PCR-RFLP yöntemlerini uygulayarak aralarında kan bağı bulunmayan 50 AAA hastasında belirlediğimiz M694V, M694I, M680I ve V726A majör nokta mutasyonları için her iki yöntemle de uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Yani sözü edilen mutasyonları belirlemek için kullandığımız ARMS ve



PCR-RFLP yöntemleri aynı doğrulukta sonuç vermektedirler. Bu nedenle bu mutasyonlarını çalışan laboratuvarlar iki yöntemden birisini tercih edebilirler.

ARMS yöntemi ile bir hastanın M694V, M680I ve V726A majör nokta mutasyonlarını belirlemek için DNA izolasyonu, PCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezi dahil olmak üzere yaklaşık 3 saat 38 dakika zamana ihtiyaç vardır. PCR-RFLP yönteminde ise bu süre DNA izolasyonu, PCR amplifikasyonu, amplifiye ürünlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi, poliakrilamid jel elektroforezi ve jelin etidiyum bromid ile boyanmasını da içermek üzere toplam olarak 6 saat 15 dakika sürmektedir. Çalışmamızda M694V; M680I ve V726A mutasyonlarının belirlenme süresi göz önüne alındığında ARMS yönteminin PCR-RFLP'ye göre daha hızlı sonuç verdiği gözlenmektedir. Nitekim Eisenberg et al.<sup>51</sup>'da ARMS yönteminin daha hızlı sonuç verdiğini ileri sürmüşlerdir.<sup>51</sup> Bütün bulgular ARMS yönteminin zaman açısından PCR-RFLP'ye göre daha üstün olduğunu göstermektedir. AAA hastalarında oldukça nadir görülen ve rutin olarak bakılmasına gerek görülmeyen M694I mutasyonunun ARMS tekniği ile belirlenmesi 5 saat 25 dakika sürmektedir. Bu sürenin oldukça uzun olması, primer çiftinden kaynaklanmaktadır. Bu primer çifti ile PCR amplifikasyonu 3 saat 10 dakika sürmekte, buna DNA izolasyonu ve elektroforez süreleri de dahil edildiğinde mutasyonun toplam belirlenme süresi 5 saat 25 dakikayı bulmaktadır.

ARMS yöntemiyle bir hastanın yukarıda sözü edilen dört mutasyonunun belirlenmesi, yaklaşık olarak 11.5 Amerikan Dolarına (AD), PCR-RFLP ile 14.6 AD'ye mal olmaktadır. Görüldüğü gibi ARMS yöntemi PCR-RFLP'ye göre daha ekonomiktir.

Eisenberg et al.<sup>51</sup> M694V, M680I ve V726A mutasyonlarını ARMS ve DNA dizi analizi yöntemlerini uygulayarak belirledikleri karşılaştırmalı çalışmalarında, ARMS yönteminin sensitivite ve spesifitesinin %100 olduğunu ve kullandıkları primer setlerinin yalancı pozitif ya da negatif amplifikasyon ürünleri vermediğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların kullandıkları primer setlerinin çalışmamızda da herhangi bir nonspesifik sonuç vermediğini gözledik.

ARMS yönteminin doğru sonuç vermesi, kullanılan primerlerin spesifitesine bağlıdır. Bu yöntemde normal diziyeye spesifik primerler genomik DNA'daki normal dizi ile hibridize olacak şekilde (match), mutant diziyeye spesifik primerler ise genomik DNA'daki mutant dizi ile hibridize olacak şekilde dizayn edilmektedir. Bundan dolayı

normal diziye spesifik primerler genomik DNA'daki normal (mutasyonsuz) diziyle, mutant diziye spesifik primerler ise genomik DNA'daki mutant diziyle hibridize olacak ve genomik DNA amplifikasyonu gerçekleşecektir. Bu genel prensibe ilave olarak çalışmamızda kullandığımız normal ve mutant diziye spesifik primerlerin 3' ucundaki sondan bir önceki nükleotidin farklı olduğu yani genomik DNA'daki nükleotidle hibridize olmayacak şekilde dizayn edildiğinden dolayı amplifikasyon daha spesifik hale gelerek non spesifik (yalancı pozitif ve yalancı negatif) sonuçlar tamamen ekarte edilip güvenilir sonuçlar elde edilmiştir.

Nadir de olsa bazı AAA hastalarında bir allelde iki farklı mutasyon bulunabilmektedir.<sup>14</sup> Bir alleldeki iki farklı mutasyonu gösterebilmek için DNA dizi analizi yapmak gerekmektedir. Çalışmamızda PCR-RFLP yöntemi ile M680I/V726A birleşik heterozigot mutasyona sahip iki hastada, bu mutasyonların aynı allel üzerinde mi yoksa karşılıklı allellerde mi bulunduğu sorusuna cevap bulabilmek için, aynı hastadan amplifiye edilen PCR ürününü M680I ve V726A mutasyonlarını göstermek için kullanılan restriksiyon enzimleriyle aynı tüp içerisinde muamele ettik ve bu işlem sonucu poliakrilamid jel elektroforezinde, kesilen bantların moleküler ağırlıklarına bakarak bu mutasyonların karşılıklı allellerde bulunduğunu gözledik. Şöyle ki, M680I ve V726A mutasyonlarını belirlemek için genomik DNA'dan amplifiye edilen PCR ürünü Alu I ve Hinf I restriksiyon enzimleriyle aynı tüp içerisinde muamele edildikten sonra poliakrilamid jel elektroforezi uygulandığında, eğer M680I ve V726A mutasyonları aynı allel üzerindeyse teorik olarak 262, 194, 126, 58 ve 40 bp'lik bantlar, karşılıklı alleller üzerinde bulunuyorlarsa 320, 136, 126, 58 ve 40 bp'lik bantlar görülecektir. Çalışmamızda M680I/V726A birleşik heterozigot mutasyona sahip iki hastada 360 bp'lik PCR ürününün Alu I ve Hinf I enzimleriyle aynı tüp içinde muamele edilip poliakrilamid jelde görüntü elde edildikten sonra kesim ürünlerinin 320, 136, 126, 58 ve 40 bp uzunluklarında olması, bu iki mutasyonun karşılıklı alleller üzerinde bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.4). PCR-RFLP yöntemi ile bu işlemi uygulamak her zaman mümkün olmayabilir. Ancak bu işlemi uygulayabilmek için öncelikle her iki mutasyonun belirlenmesinde kullanılan primerlerin ve amplifiye ürünün kesiminde kullanılan iki farklı restriksiyon enziminin çalışma tamponlarının aynı veya benzer olması gerekmektedir. ARMS yöntemi ile birleşik heterozigot

mutantların hangi allel üzerinde olduğunu saptamak söz konusu olmadığından dolayı, bu durum PCR-RFLP tekniğinin ARMS'a göre bir üstünlüğü olarak düşünülebilir.

Sonuç olarak her iki yöntemin avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte, ARMS yöntemi; restriksiyon enzimlerinin ve poliakrilamid jel elektroforezinin kullanımını gerektirmeyen, oldukça pratik, uygulanması kolay, hızlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntem olduğundan dolayı MEFV gen mutasyonlarının belirlenmesinde rahatlıkla kullanılabilir bir yöntemdir.

AAA'da MEFV gen mutasyonları ile amiloidoz arasındaki ilişki henüz tam anlamıyla açıklık kazanmamıştır. Pek çok çalışmada; M694V/M694V genotipi ile amiloid gelişimi arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür,<sup>46,59,60,61</sup> ancak bazı çalışmalarda M694V homozigot genotip ile amiloid gelişimi arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Diğer taraftan M694V homozigot genotipe sahip olmayan hastalarda da amiloid geliştiği gözlenmiştir.<sup>53,54,62,63</sup> Çalışmamızda sadece bir hastada amiloid gelişimi gözlenmiş ancak bu hastanın genotipi M694V/M680I olarak belirlenmiştir. M694V homozigot genotipe sahip 9 hastanın hiçbirisinde amiloidoza rastlanmamıştır. AAA hastalarında amiloidoz gelişimi ile MEFV gen mutasyonları arasındaki ilişkinin incelenmesi için daha geniş hasta serisine ihtiyaç duyulmaktadır.

AAA'da hastalık başlangıç yaşı, ateş, artrit, karın ve göğüs ağrısı, proteinüri gibi klinik bulgular ile MEFV genotipleri arasındaki ilişkiler ile ilgili bazı çalışmalarda; bazı klinik bulgular ile MEFV genotipleri arasında ilişki saptanmış, ancak bazı çalışmalarda bu ilişki bulunamamıştır.<sup>46,53,55,60,61</sup> Çalışmamızda da ateş, artrit, göğüs ağrısı ve proteinüri gibi klinik bulgular ile MEFV majör gen mutasyonları arasında klinik olarak anlamlı istatistiksel bir ilişki saptayamadık ( $P>0.05$ )

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### **Bu çalışma sonucunda;**

- 1- Çalıştığımız MEFV geninin dört majör nokta mutasyonu bölgemizde yaşayan 50 AAA hastasının bağımsız allellerinin %75'inde saptandı. Hastaların %62'sinde her iki allele de mutasyon gözlemlendi. Aynı tip mutasyon yönünden homozigot hasta sayısı 13 (%26), mutasyonların farklı kombinasyonlarını bir arada bulunduran (birleşik heterozigot) hasta sayısı 18 (%36) ve bir mutasyonu bilinen diğeri bilinmeyen heterozigot hasta sayısı 13 (%26) olarak belirlendi. Altı hastada (%12) ise çalışılan mutasyonların hiçbirisine rastlanılmadı. Hastalarımızın 4 majör mutasyon yönünden 12 farklı genotipe sahip olduğu görüldü.
- 2- Hastalarımızın bağımsız allellerinde en sık görülen mutasyonlar sırasıyla; M694V %43, M680I %20, V726A %9 ve M694I %3 olarak belirlendi.
- 3- Hastalarımızın %62'sinin her iki allelinde de mutasyon saptandığından dolayı, bu 4 majör mutasyon ile hastalarımızın en azından %62'sine kesin moleküler tanı konulabileceğini ortaya koyduk.
- 4- Araştırılan 4 mutasyonun belirlenmesinde kullanılan ARMS ve PCR-RFLP yöntemlerinin her ikisinde güvenilir oldukları fakat ARMS yönteminin PCR-RFLP'ye göre daha hızlı, pratik ve ekonomik olduğu saptandı.
- 5- Çalışılan mutasyonlar ile ateş, artrit, göğüs ağrısı ve proteinüri gibi klinik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı.

### **Önerilerimiz;**

- 1- Türkiye'deki diğer coğrafi bölgelerde de MEFV gen mutasyonlarının çalışılarak bölgelere göre sıklığının belirlenmesi,
- 2- AAA hastası bulunan ailelerde, fenotipik olarak sağlıklı aile fertlerinde de mutasyon taraması yapılarak potansiyel AAA hastalarının önceden tesbit edilip önlem alınması ve ailelere genetik danışmanlık hizmetinin verilmesini,

---

3- Daha hızlı, uygulanması kolay ve ekonomik olduğu için MEFV gen mutasyonlarının belirlenmesinde ARMS yönteminin tercih edilmesini önermekteyiz.



## 7. KAYNAKLAR

1. **Lightfoot RW.** Intermittent and Periodic Arthritic Syndroms. Mc Carty DJ, Koopman WJ, *Arthritis and Allied Conditions*. vol 2. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993: 1121-1137.
2. **Erken E.** Ailesel Akdeniz Ateşi. *Klinik Romatoloji*, Ankara, Hekimler Yayın Birliği, 1996; 263-268.
3. **Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Prosen L, Dean M, Richards RI, Pras M, Kastner DL.** Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Eng J Med*, 1992; 326:1509- 1513.
4. **The French FMF Consortium.** Candidate gene for familial Mediterranean fever. *Natur Genet*, 1997; 17: 25-31.
5. **The International FMF Consortium.** Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely the cause familial Mediterranean fever. *Cell*, 1997; 90: 797- 807.
6. **Alp H, Tan H, Orbak Z, Selimoğlu A.** Ailevi Akdeniz Ateşi. *Sendrom*, 1998; 10(9): 64-69.
7. **Goldfinger SE.** Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Eng J Med*, 1972; 287: 1302.
8. **Shohat M, Shohat T, Rotter JI.** Serum amyloid A and P protein genes in familial Mediterranean fever. *Genomics*, 1990; 8: 83-89.
9. **Kastner DL, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow J, Dean M, Hampsch K, Gazit E, Kovo M, Pras M.** Familial Mediterranean fever: a 90 markers exclusion map and evidence for linkage to chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet*, 1991; 58: 2115 (abstract).
10. **Shohat M, Livneh A, Zemer D, Pras M, Sohar E.** Twin studies in familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*, 1992; 44(2): 179-182.
11. **Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Schwabe AD, Rotter JI.** Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet*, 1989; 34: 168-172.
12. **Kastner DL.** Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. Koopman WJ (Ed): *A Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 1400-1441.

13. Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*, 1995; 57 :455-57
14. Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, Oddoux C, Wood G, Azzaro MP, Palumbo G, Giustolisi R, Pras M, Ostrer H, Kastner DL. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish Population. *Am J Hum Genet*, 1999; 64: 949-962.
15. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Prosen L, Dean M, Richards RI, Pras M, Kastner DL. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Eng J Med*, 1992; 326:1509- 1513.
16. The French FMF Consortium. The localisation of the familial Mediterranean fever gene to a 250 kb interval in non-Ashkenazi Jewish founder haplotypes. *Am J Hum Genet*, 1996; 59: 603- 612.
17. Levy EN, Shen Y, Kupelian A, Kruglyak L, Aksentijevich I, Pras E, Balow JE, Linzer B, Chen X, Shelton DA, Gumucio D, Pras M, Shohat M, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N, Richards RI, Kastner DL. Linkage disequilibrium mapping places the gene causing familial Mediterranean fever close to D16S246. *Am J Hum Genet*, 1996; 58: 523- 534.
18. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A 52 KD protein is a novel component of the SSA/Ro antigenic particle. *J Exp Med*, 1988; 167: 1560- 1571.
19. Jack JCW, Mather IH. Cloning and molecular analysis of cDNA encoding Bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J Biol Chem*, 1990; 265: 14481-14486.
20. Patarca R, Freeman GJ, Schwartz J, et al. Rpt-1, an intracellular protein from helper/ inducer T cells that regulates genes expression of interleukin-2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 2737-2738.
21. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2001; 19: 39320-39329
22. Fairbrother WJ, Gordon NC, Humke EW, O'Rourke KM, Starovasnik MA, Yin JP, Dixit VM. The pyrin domain: a member of the death domain-fold superfamily. *Protein Sci*; 2001, 10(9): 1911-1918
23. Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. ASC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 293: 1314-1318



24. **McDermot MF**, Genetic clues to understanding periodic fevers, and possible therapies. *Trends Mol Med*, 2002; 8(12):550-554
25. **Touitou I**. The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet*, 2001; 9: 473-483.
26. **Doğanavşargil E, Keser G**. Ailesel Akdeniz Ateşi. Klinik Romatoloji, İstanbul, Deniz Matbaası, Ege Romatoloji 1999: 467-474.
27. **Ben-Chetrit E, Levy M**. Familial Mediterranean fever. *Lancet*, 1998; 351: 659- 664.
28. **Scwabe AD, Peters RS**. Familial Mediterranean fever in Armenians: analysis of 100 cases. *Medicine*, 1974; 53: 453-462.
29. **Yazıcı H, Özdoğan H**. Familial Mediterranean fever in Turkey. In: Sohar E, Gafni J, Pras M, eds. *Proceeding of the 1<sup>st</sup> International Conference on FMF*, Tel Aviv: Freund, 1997; 66-71.
30. **Daniels M, Shohat T, Brenner-Ulman A, Shohat M**. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish Population in Israel. *Am J Med Genet*, 1995; 55: 311-314.
31. **Yılmaz E, Özen S, Balcı B, Duzova A, Topaloğlu R, Beşbaş N, Saatçi U, Bakkaloğlu A, Özgüç M**. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet*, 2001; 9: 553-555.
32. **Gersoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R**. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet*, 2001; 9(8): 634-637.
33. **Bar-Eli M, Ehrenfeld M, Levy M, et al**. Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Am J Med Sci*, 1981; 281: 15-18.
34. **Matzner Y, Ayesh S, Hochner-Celniker D, et al**. Proposed mechanism of inflammatory attacks in familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med*, 1990; 150: 1289-1291.
35. **Barakat MH, El-Khawad AO, Gumaa KA**. Metaraminol provocative test: a specific diagnostic test for familial Mediterranean fever. *Lancet*, 1984; i: 656-657.
36. **Ben-Chetrit E, Levy M**. Autoantibodies in familial Mediterranean fever (recurrent polyserositis). *Br J Rheumatol*, 1990; 29: 459-461.



37. **Swissa M, Schul V, Korish S, et al.** Determination of autoantibodies in patients with familial Mediterranean fever and their first relatives. *J Rheumatol*, 1991; 18: 606-608.
38. **Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, Seguret F, Demaille J, Touitou I.** Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, 2002; 46(10): 2785-2793.
39. **Özyılkan E, Şimşek H, Telatar H.** Tumor necrosis factor in familial Mediterranean fever. *Am J Med*, 1992; 92: 579-580.
40. **Özbek S, Erken E, Güneşçar R, Canataroğlu A.** Ailesel Akdeniz Ateşli hastalarda tümör nekroz faktör. *Çukurova Üniv. Tıp Fak Derg*, 1996; 21 (2):106- 108.
41. **Rozenbaum M, Katz R, Rozner I, et al.** Decreased interleukin 1 activity released from circulating monocytes of patients with familial Mediterranean fever during in vitro stimulation by lipopolysaccharide. *J Rheumatol*, 1992; 19: 416-418.
42. **Erken E, Güneşçar R, Özbek S, Konca K.** Serum soluble interleukin 2 receptor levels in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, 1996; 55: 852- 855.
43. **Newton CR, Grahan A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Shimit JC, Markham AF.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 1989; 11: 17(7): 2503-2516.
44. **Gersoni-Baruch R, Brik R, Shinawi M, Livneh A.** The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever: *Eur J Hum Genet*, 2002; 10(2): 145-149.
45. **Medlej-Hashim M, Rawashdeh M, Chouery E, Mansour I, Delague V, Lefrance G, Naman R, Loiselet J, Megarbane A.** Genetic screening of fourteen mutations in Jordanian familial Mediterranean fever patients. *Hum Mutat*, 2000; 15(4): 384- 390.
46. **Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, Ayzazyan A, Kouyoumdjian JD, Ajrapetyan H, Delpech M, Goossens M, Dode C, Grateau G, Amselem S.** 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*, 1999; 65: 88-97.
47. **Ben-Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D.** The E148Q mutation in the MEFV gene: Is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat*, 2000; 15(4): 385-386.

48. **Gersoni-Baruch R, Kepten I, Shinawi M, Brik R.** Direct detection of common mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) using naturally occurring and primer mediated restriction fragment analysis. *Hum Mutat*, 1999; 14(1): 91-94.
49. **Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M.** Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, 1997, 40: 1879-1885
50. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3): 1215.
51. **Eisenberg S, Aksentijevich I, Deng Z, Kastner DL, Matzner Y.** Diagnosis of familial Mediterranean fever by a molecular genetics method. *Ann Intern Med*, 1998;129: 539-542.
52. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** Molecular Cloning: a laboratory manual. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
53. **Yalçinkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, Tümer N, Akar N, Tekin M, Taştan H, Koçak H, Özkaya N, Elhan AH.** Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation independent amyloidosis. *Rheumatology*, 2000; 39: 67-72.
54. **Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçinkaya F, Akar E, Çakar N, Tümer N, Akçakuş M, Taştan H, Matzner Y.** MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mutat*, 1999; 288: 1-5.
55. **Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni-Baruch R.** Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mix pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics*, 1999; 103: e70.
56. **Centola M, Aksentijevich I, Kastner DL.** The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum Mol Genet*, 1998; 7(10): 1581-1588.
57. **Grateau G, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattan D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Dode C.** Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *QJ Med*, 2000, 93: 223-229.
58. **Nir-Paz R, Ben-Chetrit E, Pikarsky E, Hassin D, Hassin Y, Chajek-Shaul T.** Unusual presentation of familial Mediterranean fever: role of genetic diagnosis. *Ann Rheum Dis*, 2000; 59: 836-838.
59. **Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, Mimouni A, Danon Y, Lotan R, Ogur G, Sirin A, Schlezinger M, Halperg G, Schwabe A, Kastner D, Rotter JI, Fischel Ghodsian N.** Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet*, 1999; 7: 287-292.

60. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chetrit E, Cattan D, Bernot A, Dross D, Dupont M, Notarnicola C, Levy M, Rosner I, Demaille J, Touitou I. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet*, 1998; 6: 95-97.
61. Pras E, Shinar Y, Shoham N, Livneh A, Padeh S, Langevitz P, Pras M. Genotype-phenotype correlations in Israeli FMF patients. *Familial Mediterranean Fever II. International Conference*, 3-7 May, 2000, Antalya, Turkey, pp: 29-31.
62. Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN. Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *Q J Med*, 1998; 91: 603-606.
63. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, Kastner D. Familial Mediterranean fever at the Millenium. *Medicine*, 1998; 77: 268-297.



## ÖZGEÇMİŞ

Ramazan Güneşaçar 1964 yılında Adana’da doğdu. İlk, Orta ve Lise eğitimini Adana’da tamamladıktan sonra 1984 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi ve 1988 yılında mezun oldu. 1989 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji-Romatoloji Bilim Dalına uzman olarak atandı. 1994 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak İmmünoloji Bilim Dalında Bilim Uzmanı ünvanını aldı. 1998 yılında, Alman Hükümeti tarafından verilen Alman Akademik Değişim Servisi (DAAD) bursunu kazanarak Almanya Heidelberg Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Enstitüsü, Transplantasyon İmmünolojisi Bilim Dalında 6 ay süreyle başta moleküler ve serolojik doku tipleme yöntemleri, , antijen ve otoantikörlerin izolasyon ve karakterizyonu olmak üzere çeşitli immünolojik yöntemler konusunda eğitim aldı. Doktora eğitimine 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında başladı ve 2003 yılında doktorasını tamamladı. Halen İmmünoloji-Romatoloji Bilim Dalında uzman olarak çalışmakta olan Ramazan Güneşaçar evli ve iki çocuk babasıdır.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**