



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEFV GENİNDEKİ R202Q MUTASYONUNU YALNIZ
SIK GÖRÜLEN MUTASYONLARLA KOMBİNE VE
KOMPLEKS HALİNDE İKEN GEN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Yeliz DOBOOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

KAHRAMN MARAŞ 2019

T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEFV GENİNDEKİ R202Q MUTASYONUNU YALNIZ
SIK GÖRÜLEN MUTASYONLARLA KOMBİNE VE
KOMPLEKS HALİNDE İKEN GEN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Yeliz DOBOOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Metin KILINÇ

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Fatma İnanç Tolun

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Aysun Çetin


KAHRAMANMARAŞ-2019

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Yeliz DOBOOĞLU tarafından hazırlanan “MEFV genindeki R202Q mutasyonunu yalnız, sık görülen mutasyonlarla kombine ve kompleks halinde iken gen ekspresyonunun araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 29 / 07 / 2019 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin KILINÇ (DANIŞMAN)
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı , KSÜ



Prof.Dr.Fatma İNANÇ TOLUN (ÜYE)
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı , KSÜ



Prof.Dr.Aysun ÇETİN (ÜYE)
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, EÜ



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet BOŞNAK
Sağlık 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 orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Yeliz DOBOOĞLU



Bu çalışma KSÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında kendi imkanlarımızla gerçekleştirilmiştir.

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

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince mesleki konulardaki bilgi birikimini bizimle paylaşan ve tecrübeleriyle yol gösteren, her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Metin KILINÇ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a, Sayın Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ'a

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı emeği geçen değerli arkadaşım Doktor Öğretim Üyesi Eda GANIYUSUFOĞLU'na

Eğitimim süresince ilgi ve dostluğunu benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Hatice SAĞER'e

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmada , 27 karar nolu Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onayı alınmıştır

08-2018

Yeliz DOBOOĞLU

**MEFV GENİNDEKİ R202Q MUTASYONUNU YALNIZ, SIK GÖRÜLEN
MUTASYONLARLA KOMBİNE VE KOMPLEKS HALİNDE İKEN GEN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Yeliz DOBOOĞLU

ÖZET

Bu çalışmada ilk olarak klinik açıdan Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastası olduğu düşünülen ve DNA dizi analizi sonucuna göre R202Q mutasyonu ve R202Q mutasyonu ile birlikte görülen diğer mutasyonların bulunduğu hastaların gen ekspresyon düzeylerinin Real-Time PCR yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla R202Q mutasyonu ve R202Q mutasyonu ile birlikte görülen diğer mutasyonların bulunduğu 22 hasta ile sağlıklı kontrol grubu olarak 8 kişi kontrol grubu olarak gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda MEFV geninin gen ifade düzeyi referans gen olan GAPDH'ten düşük bulunmuştur. MEFV geninde R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların bulunduğu hastaların gen ifade düzeyi sağlıklı kontrol grubundan düşük bulunmuştur. R202Q heterozigot mutasyonu olan hastalar sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında geninin ifadesi düşük bulunmuştur. R202Q mutasyonunun birlikte görüldüğü M694V mutasyonunu homozigot olarak bulduran hastaların gen ifade düzeyi aynı mutasyonu heterozigot olarak bulduran hastalardan düşük bulunmuştur. Birleşik heterozigot genotipte bulunan R202Q/E148Q ve R202Q/V726A mutasyonları ile kompleks heterozigot genotipte bulunan R202Q/M694V/M680I mutasyonunun gen ifade düzeyi düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), R202Q mutasyonu, gen ekspresyonu

Sayfa sayısı: 65

Danışman: Prof. Dr. Metin KILINÇ

INVESTIGATION OF GENE EXPRESSIONS WHICH COMBINED AND COMPLEX WITH R202Q MUTATION ONLY, FREQUENT MUTATIONS IN THE MEFV GENE

(Master Thesis)

Yeliz DOBOOĞLU

ABSTRACT

In this study, the first aim was thought to be Familial Mediterranean Fever (FMF) according to Tel-Hashomer diagnostic criteria and according to the results of DNA sequence analysis detected to patients with R202Q mutation and other mutations associated with R202Q mutation it was aimed to investigate the gene expression levels by Real-Time PCR method. For this purpose, we studied 22 patients with R202Q mutation and other mutations associated with R202Q mutation and 8 individuals as healthy control investigated the gene expression levels.

As a result of the study, the gene expression level of MEFV gene was lower than the reference gene GAPDH. The expression levels R202Q mutation and coexistence of other mutations were lower than healthy control groups. The expression levels of the gene in patients with R202Q heterozygot mutations in the MEFV gene was lower than healthy control groups. R202Q mutation and together with M694V mutation in patients with homozygous gene expression level was found to be lower than patients who had the same mutation heterozygote. R202Q / E148Q and R202Q / V726A mutations in the combined heterozygous genotype and R202Q / M694V / M680I mutation in the complex heterozygous genotype were found to have low gene expression levels.

Key Words: Familial Mediterranean Fever (FMF), R202Q mutation, gene expression

Page number: 65

Supervisor: Prof. Dr. Metin KILINÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA, FMF).....	2
2.2. Tarihçe.....	2
2.3. Epidemiyoloji	3
2.4. Genetik	3
2.4.1. MEFV Geni	3
2.4.2. MEFV geni mutasyonları	4
2.4.3. Pýrin/marenostrin proteini.....	5
2.5. Patogenez	7
2.6. Klinik Belirtiler.....	8
2.6.1. Ateş	11
2.6.2. Karın ağrısı	11
2.6.3. Göğüs ağrısı	11
2.6.4. Eklem ağrısı	12
2.6.5. Cilt belirtileri.....	12
2.6.6. Nadir görülen belirtiler	12
2.6.7. Ataklar arası dönem	13
2.6.8. Amiloidoz	13
2.7. Tanı Kriterleri	13
2.7.1. Laboratuvar bulguları.....	15
2.7.2. Moleküler genetik tanı.....	15
2.8. Tedavi.....	15
2.9. Genotip-Fenotip İlişkisi	16
2.10. Moleküler Tanımlama Yöntemleri	17

2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	17
2.10.2. Real time PCR (RT-PCR).....	17
2.10.3. DNA dizi analizi	20
3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metod	21
3.2.1. DNA izolasyonu.....	21
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	21
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi.....	22
3.2.4. Exosap	23
3.2.5. Döngü sekans reaksiyonu	24
3.2.6. PCR ürünlerinin pürifikasyonu.....	24
3.2.7. DNA dizi analizi	25
3.2.8. Total RNA eldesi	25
3.2.9. Tek sarmal cDNA eldesi	25
3.2.10. MEFV geninin gen ifade düzeyinin Real Time PCR (Eş Zamanlı PCR) yöntemi ile belirlenmesi	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. MEFV Geninin PCR Amplifikasyonu Sonuçları	28
4.2. Amplifikasyonların DNA Dizi Analizi Sonuçları	28
4.3. MEFV Geninin İfade Analizi Sonuçları	30
4.3.1. MEFV geninin referans gen GAPDH ile karşılaştırılması.....	35
4.3.2. MEFV geninde R202Q mutasyonu olan hastaların gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	36
4.3.3. R202Q Heterozigot mutasyonunun gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	37
4.3.4. R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun gen ifade düzeyinin karşılaştırılması	37
4.3.5. R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması	39
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
7. KAYNAKLAR.....	43
8. ŞEKİLLER DİZİNİ	49

9. ÇİZELGELER DİZİNİ.....	50
10. EKLER.....	51
11. ÖZGEÇMİŞ	53



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	: Metiyonin
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)
CRP	: C- Reaktif Protein
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
WBC	: Beyaz Kan Hücreleri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mg	: Miligram
dl	: Desilitre

cm²	: Santimetre kare
HSP	: Henoch Schönlein Purpurası
PAN	: Poliarteritis Nadosa
p	: Kromozomun kısa kolu
°C	: Santigrat derece
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
dL	: Desilitre
g	: Gram
ng	: Nanogram
g	: Devir sayısı
M	: Molar
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
TBE	: Tris-Borik asit EDTA
ddH₂O	: Deiyonize su

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA, FMF), başlıca Akdeniz kökenli olan Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap toplumlarında görülen, tekrar eden ataklarda ateş ile birlikte peritonit, artirit, plörit ve erizipel benzeri eritem gibi klinik belirtiler gösteren, otozomal resesif geçişli inflamatuvar bir hastalıktır (1, 2, 3, 4). AAA'da görülen en önemli komplikasyon başlıca böbrekler olmak üzere diğer organlarında etkilenebildiği amiloid A (SAA) tipinde amiloidoz görülmesidir (4). Hastalıkta günlük kolşisin kullanımı atakların sıklığı ve şiddetini azaltmanın yanı sıra renal amiloidoz gelişiminide önlemektedir (3).

Ailevi Akdeniz Ateşine sebep olan MEFV geni, (MEditerraneanFeVer) 16. kromozomun kısa kolunda 16p.13.3. bölgesinde bulunmaktadır. MEFV geni, 10 ekzondan meydana gelmiş olup, sitoplazmik bir protein olan pyrin/marenostrin proteinini kodlamaktadır (5, 6, 7). Pyrin protein, inflamasyonun önlenmesinde görev yapmaktadır (7).

Farklı ülkelerle kıyaslandığında, AAA hastalığı, Türkiye'de daha fazla kişide görülmektedir. Türklere AAA görülme sıklığı 1/1000 olup, taşıyıcılık oranı ise 1/5 gibi yüksek bir düzeydedir (6).

Ailevi Akdeniz Ateşine sebep olan MEFV geninde görülen mutasyonların çoğu ekzon 2 ve ekzon 10 bölgesinde tanımlanmış olup, daha az sayıda mutasyon ekzon 1, ekzon 3, ekzon 4, ekzon 5, ekzon 8 ve ekzon 9 bölgelerinde tanımlanmıştır (8).

Çalışmamızda ilk olarak tanı kriterlerine göre AAA hastası olduğu düşünülen hastalarda bulunan R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmesi ve bu mutasyonların ekspresyon düzeylerinin Real Time PCR yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA, FMF)

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (FamilialMediterranean Fever, FMF), tekrar eden ve kendi kendini sınırlayan ataklarda ateş ile birlikte karın ağrısı, eklem ağrısı, göğüs ağrısı ve erizipel benzeri eritem görülmesi ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (4, 9). Hastalıkta görülen klinik belirtilerin 20 yaşından önce görülmesi sebebiyle çocukluk çağı hastalığı olup, görülen belirtiler sıklıkla 3 gün sürmektedir. Hastalığın en önemli komplikasyonu başlıca böbreklerin etkilendiği serum amiloid (SAA) tipinde amiloidoz görülmesi olup daha az sıklıkta karaciğer, dalak, kalp, testis gibi organlarda etkilenebilmektedir (10, 4, 11). Atakların oluşmasında fiziksel ve duygusal stres, menstruasyon ve yağlı yiyeceklerle beslenmek gibi durumlar etkili olmaktadır (1).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı, sıklıkla Türk, Ermeni, Arap ve Askenazi olmayan Yahudi toplumlarında görülmekle birlikte nadir olarak Amerika ve Avustralya'nın yanı sıra Fransa, Almanya, İtalya ve İspanya gibi Avrupa ülkelerinde de görülmektedir. (4). Dünya genelinde 100,000'den fazla Ailevi Akdeniz Ateşi hastası olduğu tahmin edilmektedir (12).

2.2. Tarihçe

Literatürde Ailevi Akdeniz Akdeniz Ateşi hastalığı ilk olarak Janeway ve Mosenthal tarafından tekrar eden ateş, abdominal ağrı ile birlikte lökositozu olan 16 yaşında Yahudi bir kız çocuğunda tanımlanmıştır (10). Siegal tarafından 1945 yılında hastalık ile ilgili "benign paroksizmal peritonitis" tanımı yapılmıştır. Bu tanımlama ile birlikte hastalığa periyodik peritonit, ailevi tekrarlayan poliserozit ve periyodik hastalık gibi adlandırmalar yapılmıştır (13). Reiman 1948 yılında Periyodik hastalık tanımlamasını yapmıştır (10). 1951 yılında Fransız doktorlar Cattan ve Mamou hastalığın ailevi olduğunu belirterek, böbrek hastalıkları ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (13, 14). Heller ve arkadaşları ilk kez 1958 yılında Ailevi Akdeniz Ateşi tanımını yaparak hastalığın genetik geçişli olduğunu belirtmişlerdir (14). Ailevi Akdeniz Ateşi olarak yapılan tanımlamada hastalığın üç belirgin özelliği, otozomal resesif geçişli genetik olması, Akdeniz kökenli toplumlarda görülmesi ve tekrarlayan ateş belirtisiyle ortaya çıkmasıdır (13).

Türkiye'de ilk olarak Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından yetişkin bir hastada "Garip Bir Karın Ağrısı" olarak tanımlanmıştır (10).

1997 yılında Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına sebep olan MEFV geni Amerikalı ve Fransız iki ayrı grup tarafından pozisyonel klonlama yapılarak 16. kromozomda haritalanmıştır. MEFV geninin ürünü olan ve 781 amino asit içeren proteini Amerikalı grup pyrin olarak, Fransız grup ise marenostin olarak adlandırmıştır. Kolşisinin 1972 yılında bulunması ile AAA hastalığında görülen atakların sıklığı ve şiddeti azalmış olup, amilodoz gelişimide önlenmiştir (14).

2.3. Epidemiyoloji

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı, başlıca yaygın olarak Akdeniz çevresinde yaşayan Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap toplumlarında görülmekle birlikte, göçler nedeniyle Amerika ve Avustralya'nın yanı sıra Fransa, Almanya, İtalya, İspanya gibi Avrupa ülkelerinde de görülebilmektedir (4, 15). AAA hastalığından, Dünya genelinde 100.000'den fazla insanın etkilendiği tahmin edilmektedir (12). Diğer ülkelerle kıyaslandığında Türkiye'de fazla sayıda AAA hastası bulunmaktadır (4). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Türkiye'de hastalığın İç Kuzey Anadolu Bölgesi'nde sık görüldüğü, Sivas ilinin yüksek prevalansa sahip olduğu, Batı Anadolu'da Trakya Bölgesi'nde hastalığın nadir olarak görüldüğü genel prevalansın 1:1000 ve sağlıklı taşıyıcılık oranlarının 1:5 olduğu bildirilmiştir (16).

Hastalığın görüldüğü diğer toplumlarda taşıyıcı sıklığının Askenazi olmayan Yahudilerde 1:5 ile 1:16 arasında, Araplarda 1:5 ve Ermenilerde 1:7 olduğu tespit edilmiştir (17). Hastalığın prevalansı İsrail'de 1:1000 civarında olup, 7 milyon olan nüfusta 10000 hasta olduğu düşünülmektedir. Ermenistan ve çevresindeki ülkelerde de AAA hastalığı yaygın olarak görülmektedir. Bu ülkelerde hastalığın prevalansı yaklaşık olarak 1:500 olup, 3 milyon nüfusta toplam hasta sayısı yaklaşık olarak 6000'dir. Orta Doğu'daki Ürdün, Suriye ve Lübnan gibi ülkelerde de AAA hastaları bulunmakta fakat sayısı tam olarak bilinmemektedir. Kuzey Afrika ülkeleri, Yunanistan, Girit, Fransa, Almanya, İtalya ve Amerika gibi ülkelerde de önemli sayıda AAA hastası bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Japonya'da AAA hastalığı ile ilgili 100 durum rapor edilmiştir (4).

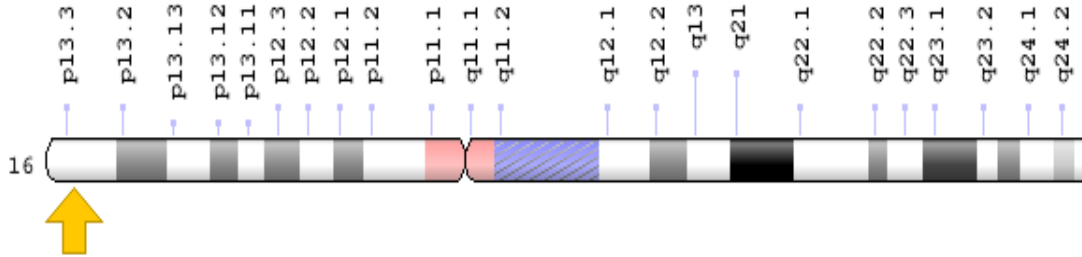
2.4. Genetik

2.4.1. MEFV Geni

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığına sebep olan MEFV (MEditerranean FeVer) geni, 1997 yılında pozisyonel klonlama yöntemi kullanılarak birbirinden bağımsız olarak Uluslararası FMF konsorsiyumu ve Fransız FMF konsorsiyumu tarafından tanımlanmıştır (1, 7, 18). Klonlama

işleminde ilk olarak Askenazi olmayan Yahudi ailelerinde kromozoma spesifik genin yerini tespit etmek amacıyla 100'den fazla polimorfik işaretleyici kullanılmıştır. Bu işlemde sonra MEFV geninin 16. kromozomun kısa kolunda, hemoglobin alfa genine göre sentromerik yerleşimli olduğu, hastalığın görüldüğü Ermeni, Arap ve Türk gibi diğer toplumlarda da doğrulanmıştır. Bu çalışmalardan sonra genin yerini tam olarak saptamak amacıyla çeşitli işaretleyiciler kullanılarak 1 milyon baz çifti içeren bölge incelenmiştir. MEFV geninin 285 kilobazlık bir bölge ile sınırlı olduğu, D16S468/D16S3070 telomerik ve D16S3276 sentromerik aralığında bulunduğu saptanmıştır (13).

Mediterranean fever geni, 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3 bölgesinde 15kb'lık bir bölgede bulunmaktadır (5, 19). MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu Şekil 2.1'de gösterilmiştir (20). 3505 nükleotid içeren bu gen, 10 ekzondan oluşmuştur ve 781 amino asit içeren sitoplazmik bir protein olan Uluslararası konsorsiyumun Pryn (Latince ateş anlamına gelen), Fransız konsorsiyumun Marenostin (Latince Akdeniz anlamına gelen) olarak adlandırdığı proteini kodlamaktadır (1, 7, 21). Pryn proteinin inflamasyon ve apoptoziste rol oynadığı düşünülmektedir (7). Yüksek oranda korunmuş genler ailesinin üyesi olan 3.7 kb'lık MEFV tamamlayıcı DNA nükleer efektör moleküller ve nükleik asit bağlayıcı proteinleri içermekte olup, hematopoez, onkojenez, embriyonik gelişim ve inflamasyonun düzenlenmesinden sorumludur (22).



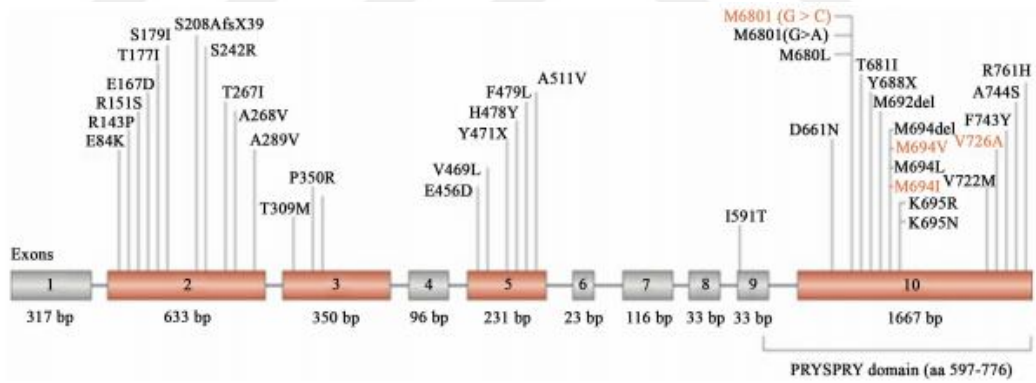
Şekil 2.1. MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu

2.4.2. MEFV geni mutasyonları

Mediterranean fever geninde bulunan yanlış anlamlı mutasyonların büyük bir kısmı karboksil ucunda bulunan ekzon 10 bölgesinde keşfedilmiştir (1). İlk olarak yaygın görülen üç yanlış anlamlı M694V, V726A ve M680I mutasyonları tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda bu mutasyonların gende görülen diğer mutasyonların %85'inden sorumlu olduğu anlaşılmıştır (18). Ekzon 10'da ilk mutasyon olarak M680I mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonda guanin yerine sitozin (transversiyon) geçmesi sonucunda 2040. nükleotidde metiyonin amino asiti yerine izolösin geçmesiyle meydana gelmiş yanlış anlamlı (missense) bir mutasyondur

(23). Bu mutasyon Ermeni ve Türk toplumlarında sık olarak görülmektedir (24). İkinci olarak bulunan M694V mutasyonunda, adenin yerine guanin (transisyon) geçmesi sonucunda 2080. nükleotidde metiyonin amino asiti yerine valin amino asiti geçmesi sonucunda oluşmuş yanlış anlamlı bir mutasyondur (23). Türk ve Askenazi olmayan Yahudi toplumlarında sık görülen bu mutasyonda, klinik açıdan amiloidozun en ciddi komplikasyon olduğu bildirilmiştir (25, 26). Üçüncü mutasyon olan V726A mutasyonunda ise timin yerine sitozin (transisyon) geçmesi ile oluşmuş 2177. Nükleotidde valin amino asidi yerine alanin amino asidi geçmesi neticesinde meydana gelmiş yanlış anlamlı bir mutasyondur (23). Türk FMF çalışma grubunun yapmış olduğu çalışmada V726A mutasyonunun görülme sıklığı %8,6 olarak bildirilmiştir (26).

Bu mutasyonların bulunmasından sonra ekzon 2’de E148Q, E167D ve T267I; ekzon 5’te F479L; ekzon 10’da I692del, K695R, A744S ve R761H mutasyonları bulunmuştur (27). MEFV geninde görülen mutasyonların çeşidine göre fenotipik özellikler farklılık göstermektedir. M680I ve M694V mutasyonlarında şiddetli klinik belirtiler görülürken, E148Q mutasyonunda daha hafif belirtiler görülmektedir (7). MEFV geninde yaygın görülen mutasyonlar Şekil 2.2.’de gösterilmiştir (28).



Şekil 2.2. MEFV geninde yaygın görülen mutasyonlar

Mediterranean feber geninde bugüne kadar (15.05.2019) 342 tane mutasyon tanımlanmış olup, mutasyon sayıları ekzonlara göre ekzon 1’de 11 mutasyon, Ekzon 2’de 112 mutasyon, ekzon 3’te 37 mutasyon, ekzon 4’te 4 mutasyon, ekzon 5’te 30 mutasyon, ekzon 7’de 3 mutasyon, ekzon 8’de 5 mutasyon, ekzon 9’da 5 mutasyon, ekzon 10’da 94 mutasyon şeklindedir (8).

2.4.3. Pyrin/marenostrin proteini

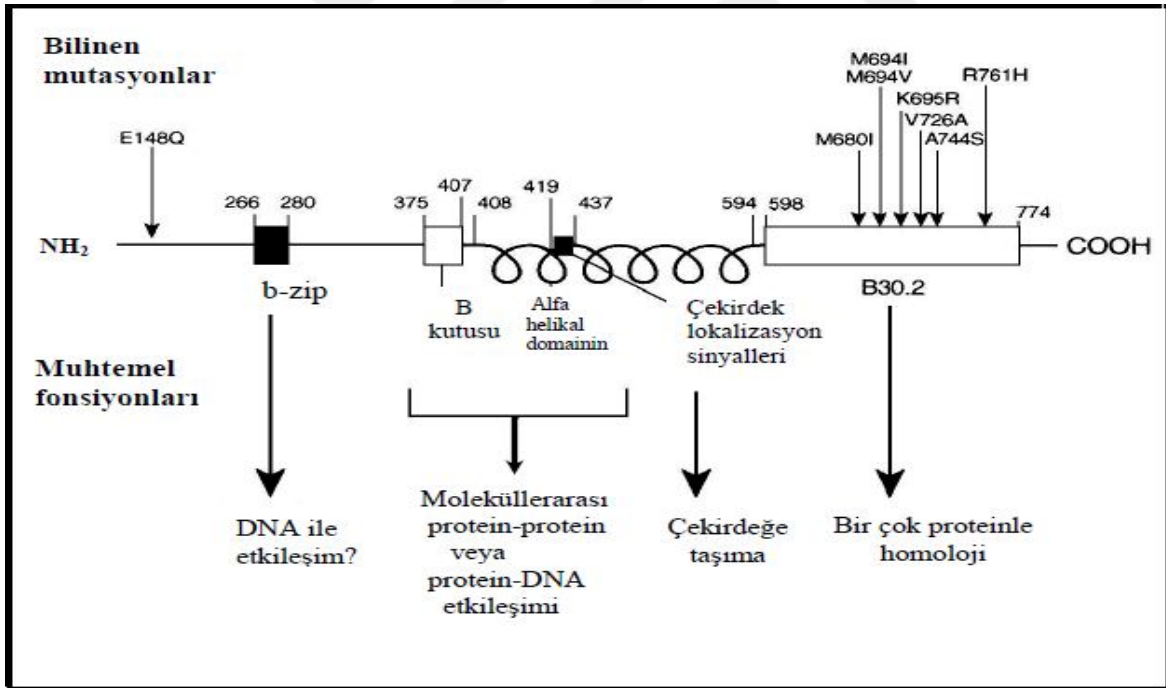
Mediterranean feber geni tarafından kodlanan proteini Fransız grup Latince Akdeniz anlamına gelen Marenostrin, Uluslararası konsorsiyum ise Yunanca ateş anlamına gelen Pyrin olarak

adlandırmıştır. Pysin protein, 86 kDa ağırlında olup, 781 amino asit içermektedir (29). Pozitif yüklü olan bu protein arjinin ve lizin amino asitlerinden oluşmuştur (23).

İnflamatuvar yanıtın düzenlenmesinden sorumlu olan pyrin proteininin ifadesi granülosit, monosit ve dendritik hücrelerde olmaktadır. İnterlökin 1 beta (IL-1 β) üretimi, nekroz faktör aktivasyonu ve apoptoziste rol oynamaktadır (30, 31).

Pysin proteinde, PYRIN bölgesi, bZIP transkripsiyon faktör bölgesi, B-box bölgesi, proteinin yapısı α -helikal olan bölge ve B30.2 bölgesi olmak üzere beş farklı bölge tanımlanmıştır. Proteinde bulunan her bir bölgenin protein-protein etkileşim yoluyla inflamasyonun düzenlenmesi, sitokin salınımı, transkripsiyonel düzenleme gibi farklı görevleri bulunmaktadır (32).

Pysin proteininin yapısı ve mutasyon bölgeleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Proteinin amino ucu $-NH_2$, karboksil ucu $-COOH$ olarak gösterilmiştir (13). Hastalıkta, ekzon 10 bölgesinde görülen önemli mutasyonlar proteinin karboksil terminal ucunda B30.2 bölgesinde bulunmaktadır (31).



Şekil 2.3. Pysin proteininin yapısı ve mutasyon bölgeleri

Hastalıkta görülen inflamasyonun nedeni kusurlu pyrin proteini üretiminden dolayı meydana gelen serozal bölgelerde artan lökosit göçü nedeniyle uygun olmayan inflamatuvar yanıt oluşumudur (2).

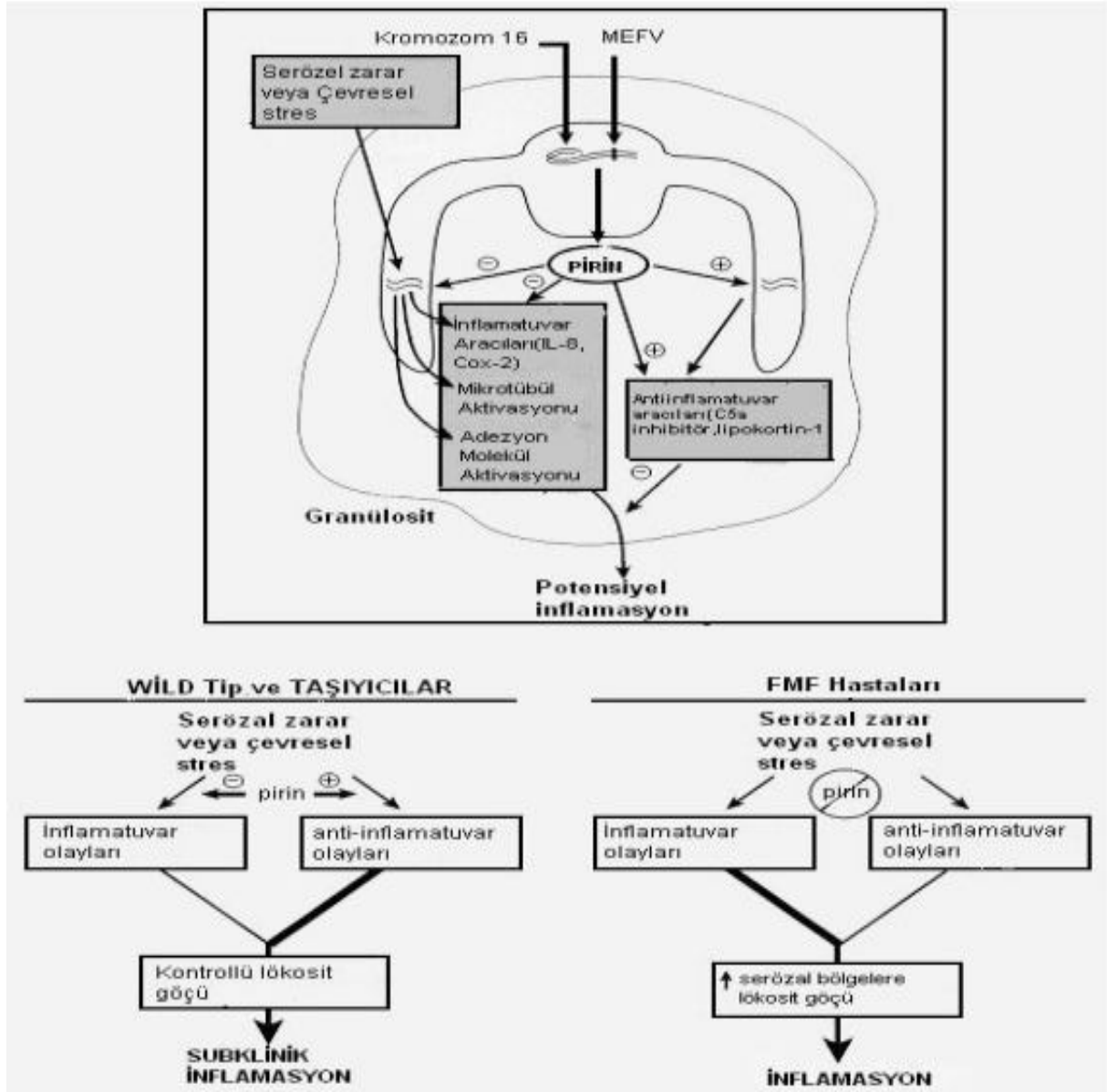
2.5. Patogenez

Mediterranean feber geninde görülen mutasyonlar sonucunda pyrin proteinin sentezinde anormallikler görülmektedir (33). Protein sentezinde görülen bozukluk sebebiyle AAA hastalığında görülen ataklarda plevra, periton, eklemler arası sıvı ve etkilenen diğer dokularda inflamasyon görülmektedir (1, 34). Atakların oluşumunda fiziksel ve duygusal stres, menstruasyon ve yüksek yağlı diyet gibi koşullar etkili olmaktadır (1).

Hastalığın patogenezini ile ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Bunlardan bir tanesi inflamasyonda rol oynayan lipokortin bir proteinin eksikliğinin hastalığa sebep olduğudur. Bir diğer hipotez ise inflamatuvar yanıtı düzenleyen bir düzenleyicinin kalıtsal olarak eksik olmasıdır. Patogenez ile ilgili bir diğer görüş ise hastalığın katekolamin metabolizmasında meydana gelen bir bozukluktan kaynaklandığıdır. Fakat bu hipotezler doğrulanamamıştır (1). AAA hastalarına ait immünolojik laboratuvar bulgularında bazı anormallikler görülmesi hastalığın immünolojik olabileceğini düşündürmüştü fakat otoimmün bir hastalık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (13).

Hastalığa ait patogenezin tam olarak anlaşılması pyrin proteinin keşfedilmesiyle olmuştur (1). Pyrin proteinin ekspresyonunun başlıca olgun granulosit ve fibroblastlarda olması inflamasyonu önlemedeki rolünü desteklemektedir (33). Pyrin protein inflamasyon aracı protein olan ve apoptoziste rol oynayan ASC (apoptotic speck like protein with a caspase recruitment domain) ile etkileşime girerek kaspaz 1 aktivasyonu ve IL-1 β üretimini artırmaktadır (34, 35). Akut atak süresince ve ataklar arası dönemde AAA hastalarında interlökin 1 beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeyi sağlıklı bireylerle kıyaslandığında yüksek olduğu görülmüştür (33). Akut ataklarda sıklıkla C reaktif protein (CRP), serum amiloid A (SAA) gibi akut faz reaktanlarının düzeylerinde de artış görülmektedir. Bu akut faz proteinleri bazı hastalarda ataklar arası dönemde ve heterozigot olan hastalarda normal değerlerin üzerinde olmaktadır (36).

Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında serozal hasar ve çevresel stres gibi koşullarda pyrin protein görevini yerine getirememekte ve serozal dokulara lökosit göçü olarak inflamasyon meydana gelmektedir. Hastalığın patogenezini Şekil 2.4.'te gösterilmiştir (13).



Şekil 2.4. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının patogenezi

2.6. Klinik Belirtiler

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığı, tekrar eden ateşli ataklarda peritonit, plörit, artirit ve erizipel benzeri eritem gibi klinik belirtiler görülmesi ile karakterizedir (37, 3). Hastaların %90'ı ilk ataklarını 20 yaşından önce geçirmişlerdir. Bu nedenle AAA çocukluk çağı hastalığıdır (38). AAA hastalığına ait ataklar başlamadan önce duygusal ve fiziksel rahatsızlıkları içeren çabuk öfkelenme, baş dönmesi, iştah artışı ve tat almada değişiklik gibi prodromal belirtiler görülmektedir (17). Tipik AAA atağı 24 saat ile 72 saat arasında sürmekte ve kendiliğinden geçmektedir. Atakların sıklığı gelişigüzel olabilmekte birlikte haftada bir, ayda bir kaç kez

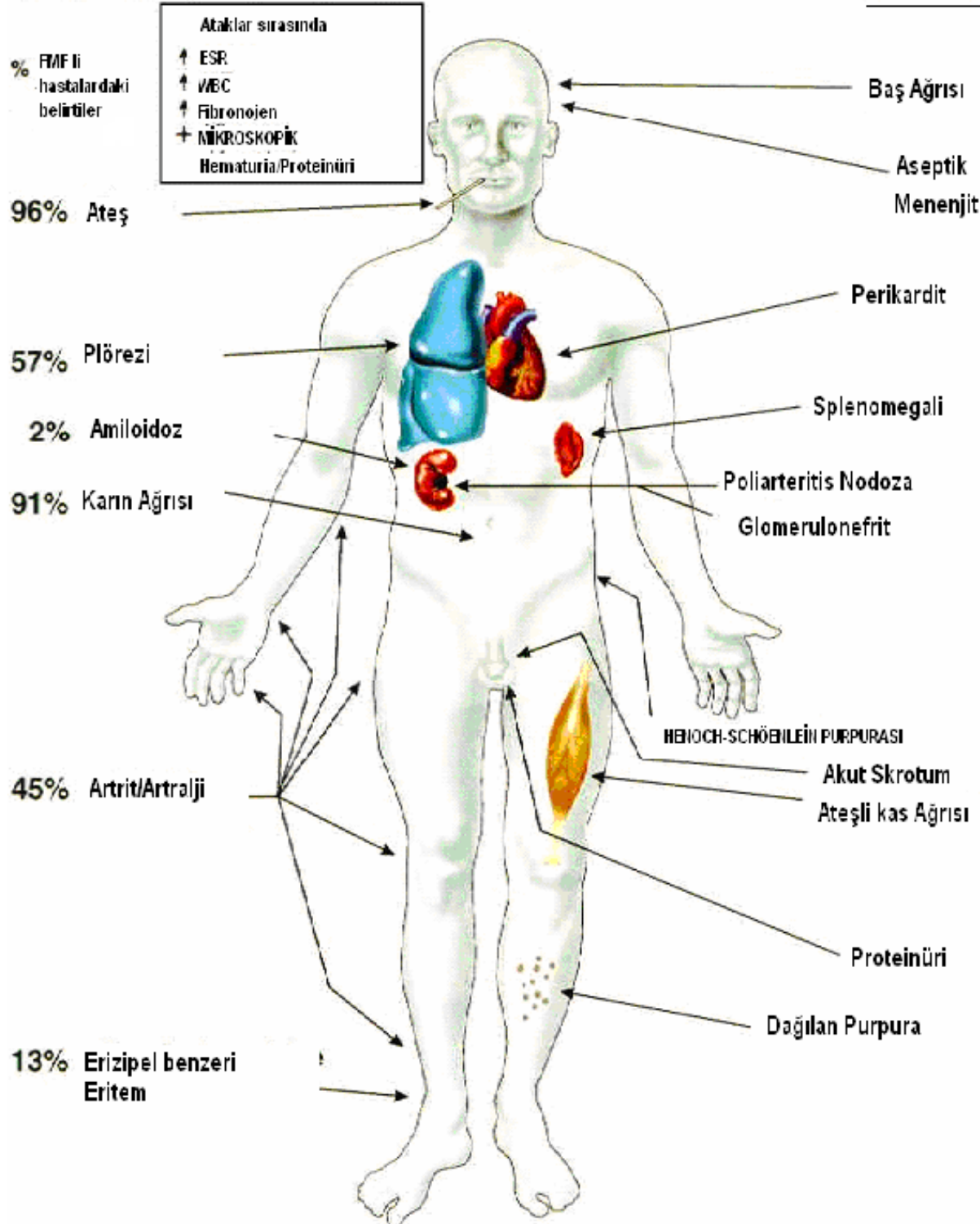
olabilmektedir. Ataklar arası dönemlerde hastalar kendilerini iyi hissederler. Duygusal stres, yorgunluk, menstruasyon, yoğun egzersiz, soğuk ortam koşulları ve yağlı diyet gibi durumlar atak oluşumunu tetiklemektedir (1, 39). Atakların sıklığı ve şiddeti yaş ilerledikçe azalmaktadır (1). Hastalığın en önemli komplikasyonu kronik böbrek yetmezliğine sebep olan serum amiloid (SAA) tipinde amiloidoz görülebilmektedir (3, 4). Günlük kolşisin kullanımı ile atakların sıklığı ve şiddetinin önlenmesinin yanı sıra amiloidoz gelişmesinde önlenilmektedir (3).

Hastalıkta görülen başlıca belirti ve semptomlar sıklığına göre ateş, karın ağrısı, göğüs ağrısı, artirit/artralji, erizipel benzeri eritem ve amiloidoz olarak sıralanabilir (2, 40). AAA hastalığında görülen klinik belirti ve bulgular Şekil 2.5'te gösterilmiştir (13).

Hastalık fenotip bakımından üçe ayrılmaktadır. Fenotip 1'de klasik hastalık belirtileri olan tekrar eden ataklarda ateş ile birlikte karın ağrısı, göğüs ağrısı ve eklem ağrısı gibi belirtiler görülmektedir. Fenotip 2'de klinik belirti olarak kişilerde amiloidoz ilk belirti olup, diğer bulgular görülmez. Fenotip 3 ise genotip yönünden sessiz (silent) homozigot ya da sessiz birleşik heterozigot mutasyonu olan bireylerde görülmekle beraber hastalığa ait klinik olarak herhangi bir belirti, semptom ve amiloidoz görülmemektedir (41).

ÖNEMLİ BELİRTİLER

DİĞERLERİ



Şekil 2.5. AAA hastalığında görülen klinik belirtiler ve bulgular. Akut skrotum dışındaki belirtiler cinsiyet ayrımı olmadan gösterilmiştir (13).

2.6.1. Ates

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığında klinik belirti olarak görülen ateş her akut atakta görülebilmektedir. Sıcaklık 38-40°C'ye kadar çıkabilir. Hafif geçirilen ataklarda düşük derecede ateş %20-30 civarındaki hastada üşüme ile birlikte ateş görülmektedir. Ateş ile ilgili belirtiler 12 saat ile 3 gün arasında sürebilmektedir. Bazen AAA'lı hastalarda tek belirti olarak görülebilmektedir. Kolşisin kullanan hastalarda ateş görülmeyebilir (1, 2).

2.6.2. Karın ağrısı

Karın ağrısı AAA hastalığının en sık görülen (%95) belirtilerindendir. Atak sırasında görülen ağrı yaygın ve lokalize olabilmekte, yaklaşık olarak 24 saat ile 72 saat arasında devam edebilmektedir (17, 26). Klinik ve patolojik bulgular akut peritonit ile uyumlu olup, belirti olarak rebound hassasiyet ve sertlik görülebilir (3, 39). Tipik ataklarda görülen peritonal inflamasyon nedeniyle bağırsak seslerinde azalma görülmekte ve konstipasyon meydana gelmektedir. %10-20 civarında hastada diyare görüldüğü bildirilmiştir (3, 13). Akut batında meydana gelen klinik tablo nedeniyle hastalara yanlış tanı konulmakta ve gereksiz laparotomi ve apendektomi yapılabilmektedir (3, 42). Karın ağrısı ile ilgili belirtiler kendiliğinden geçmesine rağmen tekrar eden ataklar bağırsaklarda tıkanmalara ve meydana gelen pelvik yapışıklıklar kadınlarda infertiliteye sebep olabilmektedir (26).

2.6.3. Göğüs ağrısı

Göğüs ağrısı AAA hastalığında plevrada oluşan inflamasyon nedeniyle görülen bir diğer klinik belirti olup, yaklaşık olarak %30 civarında hastada görüldüğü bildirilmiştir (17). Göğüs ağrısında görülen ataklar keskin şekilde ve tek taraflı olarak meydana gelmektedir. Etkilenen tarafta soluk seslerinde ve plevral sürtünme seslerinde azalma olmaktadır (38, 39, 43). Göğüs ağrısına bağlı gelişen ataklar perikardiyal ataklar ile karıştırılabilmekte ve hastalara tanı koymada zorluklar olabilmektedir. Bu nedenle ayırıcı tanı koyabilmek amacıyla elektrokardiyografi, röntgen gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (38). Göğüs ağrısı da hastalıkta görülen diğer belirtiler gibi birkaç saat veya gün devam edip, kendiliğinden geçmektedir (17).

2.6.4. Eklem ağrısı

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığında artirit yaygın ve sık olarak görülmektedir (1). Monoartirit şeklinde görülen artiritte en çok alt ekstremitedeki diz ve ayak bileği gibi eklemler etkilenmekle beraber dirsek ve kalça eklemide etkilenebilmektedir (1, 17, 26). Etkilenen eklemlerde şişlik, kızarıklık ve hassasiyet gibi belirtiler görülmektedir (17). Artirit görülen hastalarda sinoviyal sıvı bulanık görünümlü olup, fazla sayıda nötrofil içerebilmektedir (39). Artirit görülen hastaların amiloidoz yönünden risk taşıdığı bildirilmiştir. Travma ve uzun süreli egzersiz yapmak artirit ataklarının oluşumunu tetiklemektedir (26).

2.6.5. Cilt belirtileri

Cilt ile ilgili bulgular AAA hastalığında erizipel benzeri eritem olarak, keskin sınırlar içinde 10-15cm²'lik alanda meydana gelen kırmızı lezyonlar genellikle alt ekstremitede ayak bileği etrafında görülmektedir (26, 39). Ciltte kızarıklık, hassasiyet ve şişlik görülebilmektedir (39). Ciltte görülen lezyonlar 24 saat ile 48 saat içinde herhangi bir tedavi olmadan kendiliğinden geçmektedir (26).

2.6.6. Nadir görülen belirtiler

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığı ile ilgili nadir görülen belirtiler arasında vaskülit, miyalji, perikardit, splenomegali, akut skrotum, baş ağrısı ve aseptik menenjit bulunmaktadır (2, 38).

Hastalıkta görülen vaskülitler, çocuk hastalarda Henoch-Schonlein purpurası (HSP), poliarterit nodosa (PAN) ve Behçet hastalığıdır (26, 38). Vaskülitlerin AAA hastalarında neden görüldüğü anlaşılamamakla birlikte küçük damarların vaskülitli olan HSP %2,6-5 arasında, poliarterit nodosanın ise %0,8-1,0 arasında AAA hastasında görüldüğü bildirilmiştir (26).

Miyalji, AAA hastalığında nadir olarak görülen bir başka belirti olup, artirite bağlı olarak kol ve bacaklarda ağrı olabilmektedir. Miyaljide görülen ataklar 3 haftadan fazla sürebilmektedir (1, 26).

Perikardit nadir olarak görülmekle birlikte AAA hastalarında atak sırasında retrosternal ağrı olarak görülmektedir (44).

Splenomegalinin yaklaşık olarak %30 AAA hastasında görüldüğü ve dalak büyümesinin amiloid birikimine bağlı olmadığı bildirilmiştir (1, 3).

Akut skrotum, AAA hastalığında nadir olarak görülmekle birlikte, ataklar genellikle tek taraflı olup, etkilenen tarafta şişlik, hassasiyet ve kızarıklık görülebilmektedir (38).

Menenjitte AAA hastalığında nadiren görülmektedir. Tekrar eden aseptik menenjit atakları kolşisin tedavisi ile düzeltilmektedir (45).

2.6.7. Ataklar arası dönem

Ataklar arası dönemde kronik artirit dışında hastalarda ateş ve inflamasyon gibi belirtiler görülmemektedir. Nadir olarak rahatsızlık ve hafif ateş gibi belirtiler olabilir. Bu dönemde fiziki muayenede genellikle amiloidoz olmadan splenomegali görülebilmektedir. Laboratuvar sonuçlarında hafif anemi, fibrinojen düzeyi ve serum immunoglobulinlerinde artış olabilmektedir (13).

2.6.8. Amiloidoz

Amiloid A proteini birikiminden kaynaklanan amiloidoz, AAA hastalığının en ciddi komplikasyonudur. Bu protein karaciğerde üretilen ve akut faz reaktanı olan serum amiloid A'nın (SAA) ayrılma ürünüdür (2). Amiloid A proteini, sıklıkla böbrekler olmak üzere çeşitli organ ve dokularda birikerek tahribat ve yetmezliklere sebep olmaktadır (17). AAA hastalığına bağlı olarak gelişen amiloidozda en sık görülen belirti nefrotik sendrom gelişmesidir (2). Amiloidoz gelişmesinde, etnik köken, genotip, cinsiyet ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (13, 45). Amiloidoz tanısında rutin idrar tetkikleri önemlidir (13). Ayrıca tanının doğrulanması amacıyla renal biyopsi yapılmaktadır. Renal biyopsi duyarlı bir yöntem olup, rektal ve kemik iliği biyopsisinde kullanılabilir (26). Düzenli kolşisin kullanımı ile amiloidoz gelişimi önlenmektedir (2).

2.7. Tanı Kriterleri

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının klinik olarak tanısının konulabilmesi için minimum üç atak görülmesi ve bu ataklarda ateş ile birlikte peritonit, sinovit, plörit, erizipel benzeri eritem olması ve 15 yaşından önce AA tipinde amiloidoz görülmesi gibi belirtilerin olması gerekmektedir. Tanıyı desteklemek amacıyla hastalık yaşının 20'den önce olması, aile öyküsünde amiloidoz ya da AAA hastalığının olması, kolşisin tedavisine yanıt alınması gibi kriterler kullanılmaktadır (26, 45). Hastalarda atipik belirti varsa ve etnik köken, aile öyküsü ve kolşisine yanıt gibi durumlar sorgulandıktan sonra tanı konulamıyorsa laboratuvar testleri ve genetik testler ile tanı desteklenmektedir (37, 38).

Klinik tanıda çeşitli tanı kriterleri kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılanlar Tel Hashomer ve Livneh tanı kriterleridir. Pras tarafından tanımlanmış olan tanı kriterine göre AAA hastalığı tanısı konulabilmesi için kısa süreli ateşli serozit atağı olması ve kolşisin

tedavisine pozitif yanıt alınması gerekmektedir. Son olarak Yalçinkaya ve arkadaşları tarafından yeni tanı kriterleri tanımlanmıştır (26). Tel Hashomer tanı kriterine göre kesin tanı için 2 major kriter ya da bir majör kritere ek olarak 2 minör kriter olması gerekmektedir. Muhtemel tanı için ise bir majör kritere ek olarak bir minör kritere ihtiyaç vardır (46). Tel Hashomer tanı kriteri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (26).

Çizelge 2.1. Tel Hashomer Tanı Kriterleri

Majör kriterler

- Tekrar eden ataklarda ateş ile birlikte serozit olması
- Amiloid A tipinde amiloidoz gelişmesi
- Koşisin tedavisine yanıt alınması

Minör kriterler

- Ateşli atakların tekrarlayıcı özellikte olması
 - Erizipel benzeri eritem görülmesi
 - Birinci derece akrabalarda hastalık öyküsü olması
-

Livneh’in tanı kriterine göre hastalığın tanısı için en az bir major kriter ya da en az iki minör kriter olması gerekmektedir. Livneh’in tanın kriterleri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (26).

Çizelge 2.2. Livneh Tanı Kriterleri

Majör kriterler

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

Minör kriterler

- İnkomplet ataklarda karın, akciğer, eklem gibi bir ya da daha fazla bölgenin etkilenmesi
 - Bacakta egzersiz ile ağrı oluşması
 - Kolşisin tedavisine yanıt alınması
-

Yalçinkaya ve arkadaşlarının çocuk hastalardaki tanı kriterlerine göre hastalığın olabilmesi için en az iki kriter olması gerekmektedir. Bu kriterlere göre üç ataktan fazla olmak

üzere 6-72 saat arasında devam eden 38°C üzerinde ateş olması, karın ağrısı olması, göğüs ağrısı olması, artrit olması ve oligoartrit şeklinde olması, ailede AAA hastalığı olması gerekmektedir (26).

2.7.1. Laboratuvar bulguları

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığına ait spesifik laboratuvar testi olmamakla birlikte atak süresince C reaktif protein (CRP), fibrinojen ve serum amiloid A gibi akut faz reaktanlarında artış görülmektedir. Ayrıca eritrosit sedimentasyon hızı ve beyaz kan hücre (WBC) sayımında da artış meydana gelmektedir (1; 17). Bu testler atak arasında normal değer aralığında bulunmaktadır (1). İdrar tetkikinde hamatüri ya da proteinüri tespit edilebilir (17).

2.7.2. Moleküler genetik tanı

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığına sebep olan MEFV geninin tanımlanmasıyla birlikte doğru tanının konulabilmesi mümkün olmuştur (38, 43). MEFV geninde ekzon 2, 3 ve 10 bölgeleri mutasyonların en sık görüldüğü bölgelerdir (43). Hastalarda en sık görülen mutasyonlar ekzon 10'da M694V, V726A, M680I ve M694I; ekzon 2'de ise E148Q'dur (39). Hastalığa ait bugüne kadar 340'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (8).

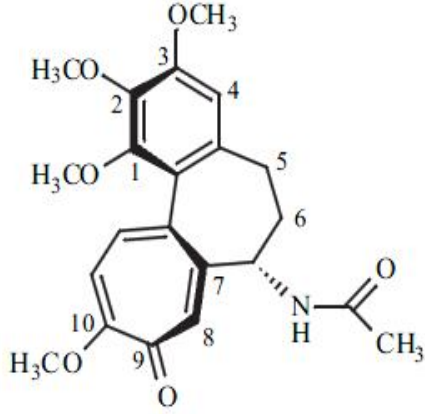
2.8. Tedavi

Kolşisin, çayır safranının Latince adı olan Colchicum (safran) türündendir (1,17). Bu bitki Karadeniz'in Doğu kıyısında Kolşis adı verilen bölgede yetişmektedir (1). Kolşisin elde edildiği çayır safranı bitkisi Şekil 2.6'da gösterilmiştir (47). Kolşisin ilk olarak gut hastalığının tedavisinde Alexander Tralles tarafından kullanılmıştır (1). Sonrasında 1972 yılında Goldfinger tarafından kolşisin AAA hastalığına ait atakları kontrol altına almadaki ve amiloidoz gelişimini önlemedeki etkisi açıklanmıştır (17, 48).



Şekil 2.6. Çayır safranı (colchicum autumnale) bitkisi

Kolşisin kimyasal olarak trisiklik alkaloid yapılu olup, trimetoksifenil halkası, 7 üyeli bir halka ve 7. pozisyonda asetamit ve bir tropolonik halkadan oluşmuştur (47). Kimyasal formülü N-(5, 6, 7, 9, tetrahidro-1, 2, 3, 10, tetrametoksi-9 okzobenzo heptain-7-il olup, yapısı Şekil 2.7.'de gösterilmiştir (1).



Şekil 2.7. Kolşisinin kimyasal yapısı

Kolşisin etanol ve kloroformda serbestçe çözünebildiği için lipit yapılu bileşiklerde de iyi çözünebilmektedir. Bu nedenle vücut dokularında geçişi hızlı olmaktadır. Bu nedenle vücut dokularında geçişi hızlı olmaktadır. Oral kolşisin alımı sonrasında jejunum ve ileumda ilaç absorbe olduktan sonra başlıca karaciğerde metabolize olarak yaklaşık olarak %10-25'i değişmeden idrarla atılmaktadır (47).

Kolşisin normal böbrek fonksiyonu olan ve proteinürisi olmayan hastalarda günlük doz olarak 1-2 mg arasında kullanıldığında etkili tedavi sağlanmaktadır. Hamilelerde emzirme süresince de etkili ve zararsız bir şekilde kullanılabilir (17, 48). İlacın en sık görülen yan etkileri karın ağrısı, kramp, diyare gibi gastrointestinal belirtilerdir (17).

2.9. Genotip-Fenotip İlişkisi

Fransız AAA konsorsiyumu tarafından AAA hastalığına sebep olan M694V, M680I, V726A ve M694I mutasyonlarının %85 oranında görüldüğü bildirilmiştir (9). En sık görülen klinik belirtilerin ateş (%94,1), karın ağrısı (%68,6), artirit (%40,2), göğüs ağrısı (%4,9), erizipel benzeri eritem (%4,9) olduğu bildirilmiştir (49). Hastalıkta görülen klinik belirtilerin özelliği etnik kökenlere göre farklılık göstermekle birlikte, M694V mutasyonu Askenazi olmayan Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap toplumlarında sık görülmektedir (9). M694V homozigot mutasyonu diğer yaygın görülen mutasyonlarla kıyaslandığında amiloidoz gelişimine

yatkınlık olduğu, erken başlangıç yaşı, atak süresince yüksek ateş, splenomegali gibi ciddi klinik belirtilerin görüldüğü bildirilmiştir (12, 49). V726A mutasyonu, Askenazi Yahudi ve Ermeni toplumlarında görülmekle birlikte amiloidoz görölme sıklığı düşüktür. M680I mutasyonu sıklıkla Ermenilerde görülmektedir. Bu mutasyon, hafif fenotipik özellikte olup, amiloidoz görölme sıklığı düşüktür (9). Ekzon 2’de sık görülen E148Q mutasyonunun ise amiloidoz gelişimi bakımından düşük riskli olduğu bildirilmiştir (29).

2.10. Moleküler Tanımlama Yöntemleri

2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); deoksiribonükleik asitin (DNA) çok sayıda kopyasının elde edildiği amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem 1980 yılında Kaliforniya’da Dr. Kary Mullis tarafından keşfedildi. Moleküler biyolojide, tıpta tanı amacıyla, genom dizilemede, mutasyonların belirlenmesinde, gen ekspresyon çalışmalarında, patojenlerin belirlenmesi için kullanılmaktadır (50, 51, 52) PCR yöntemi, çabuk, ucuz, kolay uygulanabilmesi ve az miktarda DNA materyaline ihtiyaç olması nedeniyle yaygın kullanım alanlarına sahiptir (52). 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 (50). PCR, farklı sıcaklık koşullarında takip eden 3 önemli aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar, denatürasyon, yapışma ve uzamadır (50, 52). İlk olarak, DNA yüksek sıcaklıkta (90-97°C arasında) denatüre olarak çift sarmalı açılır. Açılan DNA sarmalına spesifik primer bağlanır. (yapışma). Son olarak istenilen bölgenin polimerizasyonu gerçekleşir (uzama) (52). 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 yürütüldükten sonra Etidyum Bromür içeren boya ile muamele edilerek durumu incelenir (50).

2.10.2. Real time PCR (RT-PCR)

Real-time PCR (RT-PCR) yöntemi, amplifikasyon ürünün floresan özellikli boyalar kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (50, 53, 54). RT-PCR cihazı üç temel yolla floroforlar için uyarılma enerjisi sağlamaktadır. Bunlar tungsten veya halojen lambalar, ışık yayan diyot (LED) ya da lazerdir (50, 53). 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,

fotoçoğaltıcı tüpler ya da diğer tipteki fotodedektör kullanılmaktadır. Sınırlı dalga boyuna sahip filtreler ya da kanallar, fotodedektörle ölçüm yapılırken istenilen dalga boyuna geçiş yapmak için kullanılmaktadır (53).

RT-PCR cihazında sonuçlar, mutlak kantitasyon (standart eğri) ve bağıl kantitasyon olmak üzere iki metot kullanılarak kantitatif analiz edilir (55). 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 (56). 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 (57). Genellikle referans kontrol genler ifade düzeyleri sabit olduğu için tercih edilmektedir (55).

Real Time PCR’da kullanılan belirleme teknolojileri

RT-PCR teknolojisinde kullanılan belirleme teknolojileri, hedefe spesifik olmayan belirleme teknolojileri ve hedefe spesifik belirleme teknolojileri olmak üzere iki çeşittir (58, 59).

Hedefe Spesifik Olmayan Belirleme Teknolojisi

SYBR Green boya, hedefe spesifik olmayan belirleme teknolojisinde en yaygın kullanılan boya olup, floresan ışımaya çift zincirli DNA molekülüne bağlanarak yapmaktadır (55, 59). Çift iplikli DNA molekülünün konsantrasyonuna bağlı olarak meydana gelen ışımaya miktarı artmaktadır (56).

Hedefe Spesifik Belirleme Teknolojileri

Taq Man Prob Teknolojisi

Taq Man prob yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Spesifik DNA dizilerini belirlemek amacıyla floroförler ile işaretlenmiş floresan ışımaya yapabilen oligonükleotid probalar kullanılmaktadır. 25-30 nükleotid uzunluğunda dizilime sahip TaqMan probun 5’ ucuna floresan raportör boya, 3’ ucuna ise söndürücü olarak adlandırılan boyalar kovalent olarak bağlanmıştır (55, 60). Boyalar çeşitli olup, 5’ ucunda, 6-karboksifloresin (FAM), tetrakloro-6-karboksi floresin (TET), heksakloro-6-karboksi floresin (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 kullanılabilir ideal bir yöntemdir (55, 56).

Moleküler Boncuk Teknolojisi

Moleküler boncuk teknolojisinde kullanılan tek zincirli oligonükleotid hibridizasyon probu saç tokasına benzemektedir (60). Bu yöntemde moleküler boncuklar tek zincirli tamamlayıcı DNA molekülüne kovalent bağlı 5' ucunda floresan boya ve 3' ucunda ise söndürücü boya içeren proba bağlanmıştır (55). Probun saç tokasına benzeyen yapısı diğer düz yapıli problemlarla karşılaştırıldığında spesifik olup, prob hedefe moleküle bağlandığında termodinamik açıdan kararlı yapı meydana gelmektedir. Bu özelliklerden dolayı moleküler boncuk yöntemi allellik ayrımı ve nokta mutasyonların tanımlanabilmesi için kullanılmaktadır (55, 56).

Akrep Primer Teknolojisi

Moleküler boncuk teknolojisine benzeyen akrep primer teknolojisinde kullanılan prob saç tokasına benzemekte ve akrep primerler proba kovalent olarak bağlanmaktadır (55, 59, 60). Proba bağlı olan akrep primer PCR reaksiyonunun uzama aşamasında hedef diziyeye bağlanmaktadır (55). Akrep primer teknolojisinin hassas bir yöntem olması meydana gelen sinyallerin güçlü olmasından kaynaklanmaktadır. Bu yöntem mutasyon tespitinde kullanılmaktadır (55, 60).

FRET Teknolojisi

Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET) problemleri teknolojisinde hibridizasyon ya da Light Cycler olmak üzere iki tane oligonükleotid prob kullanılmaktadır (61; 62). Bir probun 3' ucunda bulunan floresan verici olan ve 480nm dalga boyunda ışımaya yapabilen FAM gibi bir boya floresan alıcı olan 5' ucu ise uzun dalga boyunda ışımaya yapabilen ROX, TAMRA gibi boya ile işaretlenmiştir (61). Bu yöntemde, hedef diziyeye prob bağlandığında 3' ucundaki boya 5' ucundaki boya tarafından baskılanmakta ve 5' ucunda bulunan ikinci probun uyarılması sonucunda üçüncü dalga boyunda bir ışımaya meydana gelmekte ve bu ışımaya ölçülmektedir (62). Bu yöntem yüksek spesifiklikte belirleme yapabilmektedir (61).

2.10.3. DNA dizi analizi

DNA dizi analizi yönteminde PCR ile amplifiye edilmiş DNA parçaları analiz edilmektedir (63). Adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarında meydana gelen değişiklikler incelenebilmektedir (64). Sanger dizi analizi en sık kullanılan yöntemdir (63). Bu yöntemde dideoksinükleotid trifosfat (ddNTPs) kullanılarak DNA dizisinin sonlandırılması amaçlanmaktadır. Sanger yönteminde tek zincirli kalıp DNA, primer, DNA polimeraz, floresan ya da radyoaktif boya ile işaretlenmiş nükleotidler ve DNA uzamasını durdurmak amacıyla ddNTPs gerekmektedir (64). Dizi analizi ile gende detaylı olarak incelenebilmektedir (65).



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 ve gen sekans analizi sonucuna göre R202Q mutasyonunu yalnız ve birlikte olduğu diğer mutasyonları bulunan 22 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 çözültisi 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 çözültisi eklenip, 11000g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra altta kalan kirli süzüntü tüpü atılarak tüp temiz toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 600µl B5 çözültisi 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 çözültisinden 100µl eklenerek 1 dakika oda ısısında bekletildi ve 11000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan çözültiden DNA elde edildi.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Çalışmada uyguladığımız PCR metodunda ekzon 2 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 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	40 saniye
		62 °C	1 dakika
		72 °C	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'GTAAATGTGATTCTGGATGCA3', 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 görüntüledi. Görüntülerde DNA olup olmadığına bakıldı ve bilgisayara kaydedildi.

3.2.4. Exosap

Görüntüleme sonucunda elde edilen PCR ürünleri, kirlilik ve dimer yapı oluşumunu engellemek amacıyla exosap çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu işlemde Ekzon 2, 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 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 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 aralıklarla 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'lardan 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 Aşamaları	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Süre
1	Enzim Aktivasyonu	95 °C	2 dakika
2	Aplifikasyon (45 döngü)	95 °C	15 saniye
		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.

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

Denklem 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplama formülü (57)

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

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{GenCt} - \text{ReferansCt})}$$

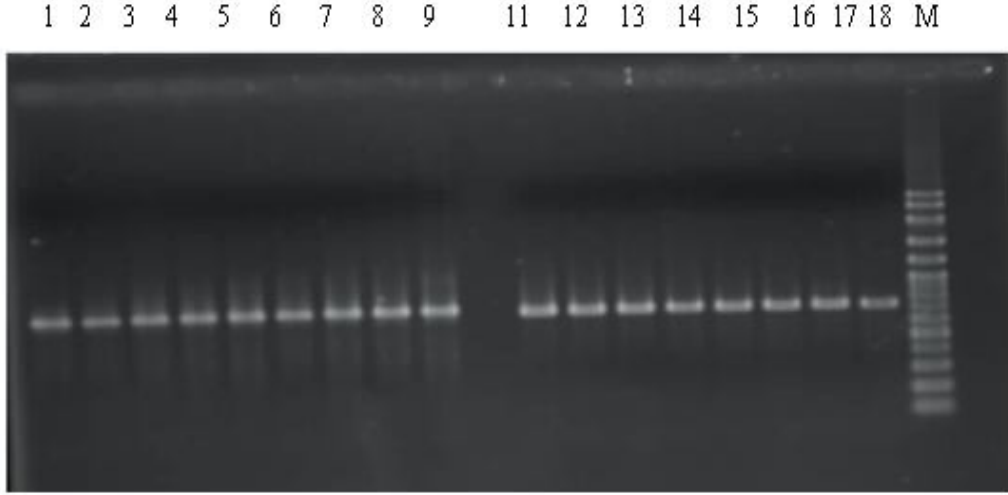
Denklem 3.2. $2^{-\Delta Ct}$ değeri hesaplama formülü (57)



4. BULGULAR

4.1. MEFV Geninin PCR Amplifikasyonu Sonuçları

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



Şekil 4.1. PCR amplifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz ekzon 2 ve ekzon 10 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.

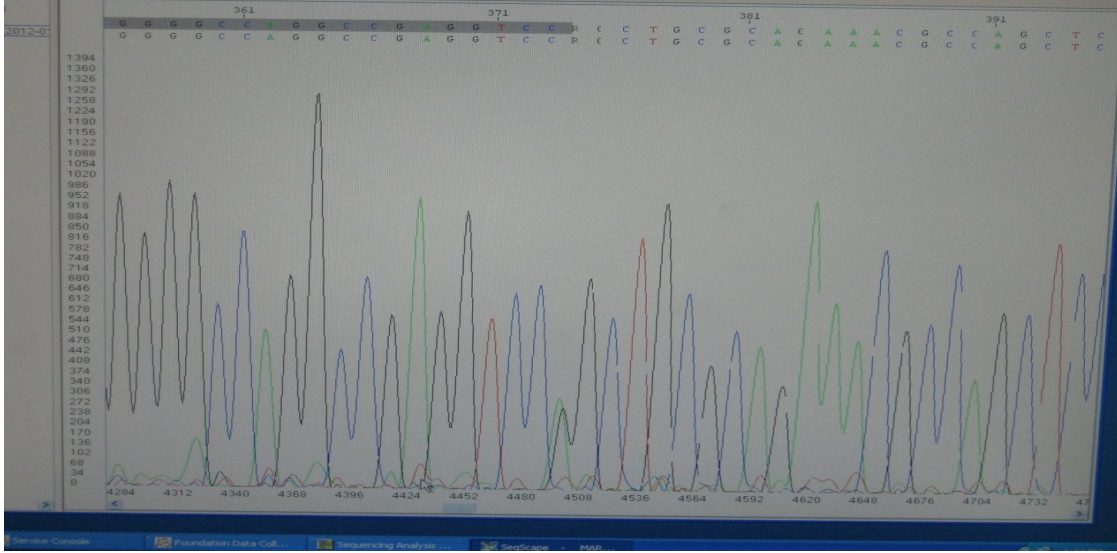
4.2. Amplifikasyonların DNA Dizi Analizi Sonuçları

DNA dizi analizi sonucuna göre çalışmada 22 tane MEFV geninde R202Q mutasyonunu yalnız ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonları olan AAA hastası ile 8 tane sağlıklı birey (kontrol) olmak üzere toplam 30 kişi çalışıldı. DNA dizi analizinden elde ettiğimiz sonuçlara göre olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

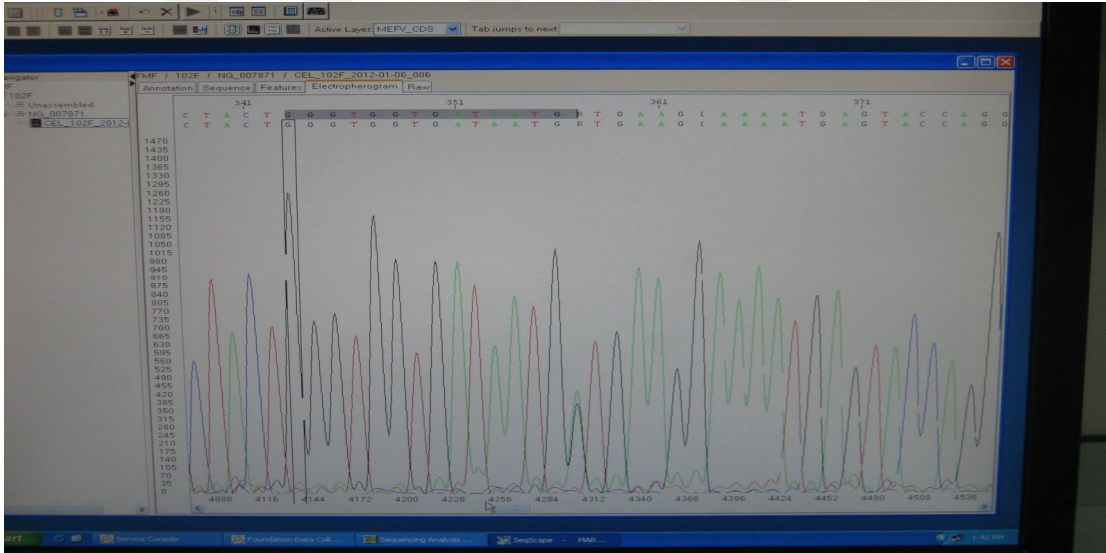
Çizelge 4.1. Olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı

Mutasyon	Genotip	Hasta sayısı
Heterozigot	R202Q/0	6
Birleşik Heterozigot	R202Q/M694V R202Q/E148Q R202Q/V726A	5 1 2
Kompleks Heterozigot	R202Q/M694V/M680I	3
Birleşik Homozigot	R202Q/R202Q+M694V/M694V	5
Normal Genotip		8
Mutasyonlu genotip		22
Toplam		30

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 4.2. Ekzon 2 bölgesinde görülen R202Q heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü



Şekil 4.3. Ekzon 10 bölgesinde görülen M694V heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü

4.3. MEFV Geninin İfade Analizi Sonuçları

Ekzon 2 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 A_{260}/A_{280} 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 izelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. MEFV genine ait cDNA konsantrasyonları ile C_t değerleri

Hasta No	cDNA Konsantrasyonu (ng/ μ L)	MEFV genine ait C_t değerleri
1	1109,6	32,8728
2	971,0	32,6946
3	951,6	32,9635
4	948,6	31,4024
5	980,6	36,5804
6	933,4	30,67617
7	1066,7	33,2692
8	1018,1	33,2643
9	1029,0	33,2351
10	1076,6	30,1599
11	1089,7	29,8799
12	1102,8	30,4150
13	1006,7	29,9242
14	1188,8	29,5744
15	1086,3	29,9822
16	1080,1	29,7265
17	1096,8	29,8138
18	1117,3	29,8485
19	1066,6	29,4948
20	1019,5	29,9604
21	1017,5	29,9650

22	1033,2	29,5525
23 kontrol	1037,6	29,5231
24 kontrol	1159,0	31,8331
25 kontrol	1016,4	31,5688
26 kontrol	963,2	29,6631
27 kontrol	1038,6	34,5876
28 kontrol	1068,9	32,5925
29 kontrol	1052,0	29,9051
30 kontrol	952,3	30,4817

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.	0,218009	1,503274	0,1450706
2	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,246665	2,319604	0,1063746
3	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,204726	1,724829	0,1187332
4	Ekzon 2: R202Q heterozigot	0,604103	1,083082	0,5579475

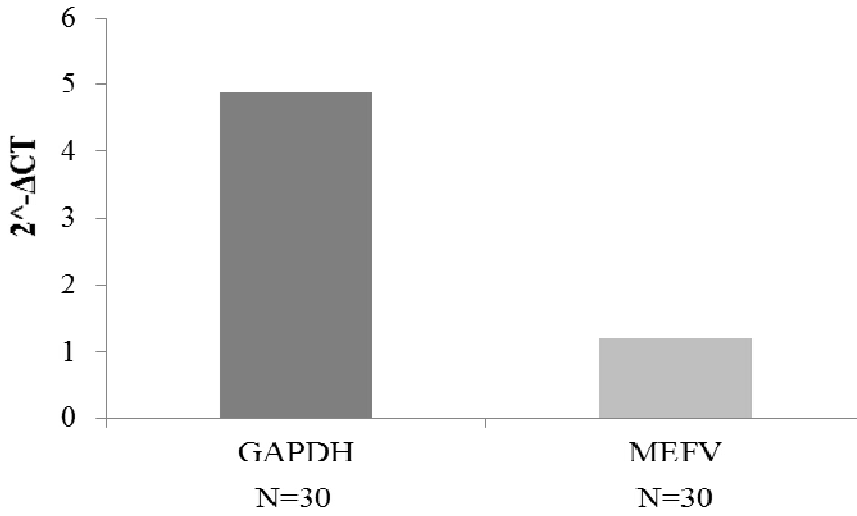
	mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.			
5	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,016686	1,133385	0,0147271
6	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,165632	1,449317	0,1143202
7	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	0,166201	1,216409	0,1366776
8	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	0,169596	1,481219	0,1145355
9	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	1,429296	1,195547	1,1959111
10	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	1,735538	1,235801	1,4048477
11	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	1,197664	1,131701	1,0586361
12	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	1,683029	0,723522	2,3269299
13	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot mutasyonu tespit edildi.	2,144772	1,262147	1,6998659
14	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	1,616715	1,569323	1,0305395
15	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	1,930273	2,807612	0,6877414

16	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: V726A heterozigot mutasyonu tespit edildi.	1,816909	1,417079	1,2825750
17	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V heterozigot ve M680I heterozigot mutasyonları tespit edildi.	1,773741	0,952667	1,8624844
18	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekson 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	2,266535	2,517329	0,9006707
19	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: V726A heterozigot mutasyonu tespit edildi.	1,641338	2,626387	0,6251479
20	Ekzon 2: R202Q heterozigot ve E148Q heterozigot mutasyonları tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	1,636108	2,500654	0,6544882
21	Ekzon 2: R202Q heterozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	2,177572	2,644037	0,8238509
22	Ekzon 2: R202Q homozigot mutasyonu tespit edildi. Ekzon 10: M694V homozigot mutasyonu tespit edildi.	2,325002	2,859571	0,8133285
23 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	2,222464	4,074914	0,0254135
24 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,448182	1,735648	0,2583071
25 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,538280	1,557519	0,3457155

26 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	2,017068	4,906954	0,0511433
27 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,066414	1,321686	0,0502664
28 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	0,264763	1,443001	0,1835420
29 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	1,705512	2,490775	0,6849575
30 kontrol	Ekzon 2: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 3: Mutasyon tespit edilmedi. Ekzon 10: Mutasyon tespit edilmedi.	1,143551	0,841959	0,0301734

4.3.1. MEFV geninin referans gen GAPDH ile karşılaştırılması

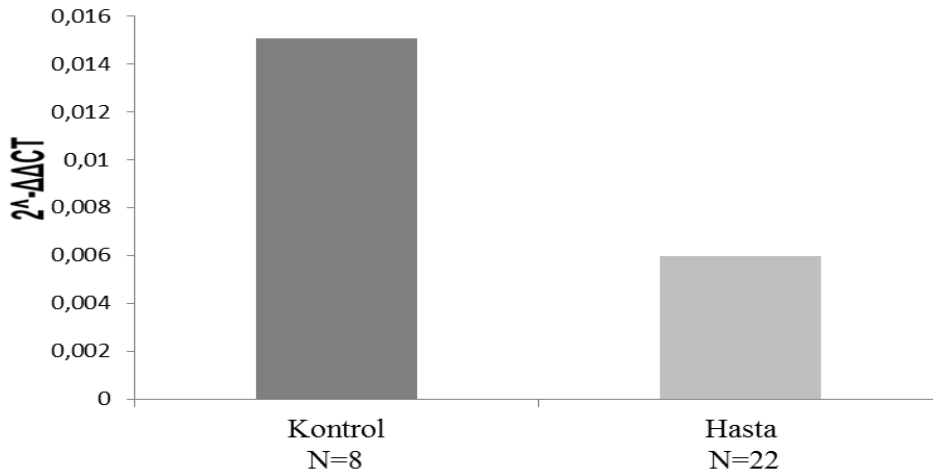
$2^{-\Delta Ct}$ formülüne göre elde ettiğimiz sonuçlarda MEFV genini, referans gen olan GAPDH ile kıyasladığımızda MEFV geninin ifade düzeyinin düşük olduğu görülmüştür. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması

4.3.2. MEFV geninde R202Q mutasyonu olan hastaların gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması

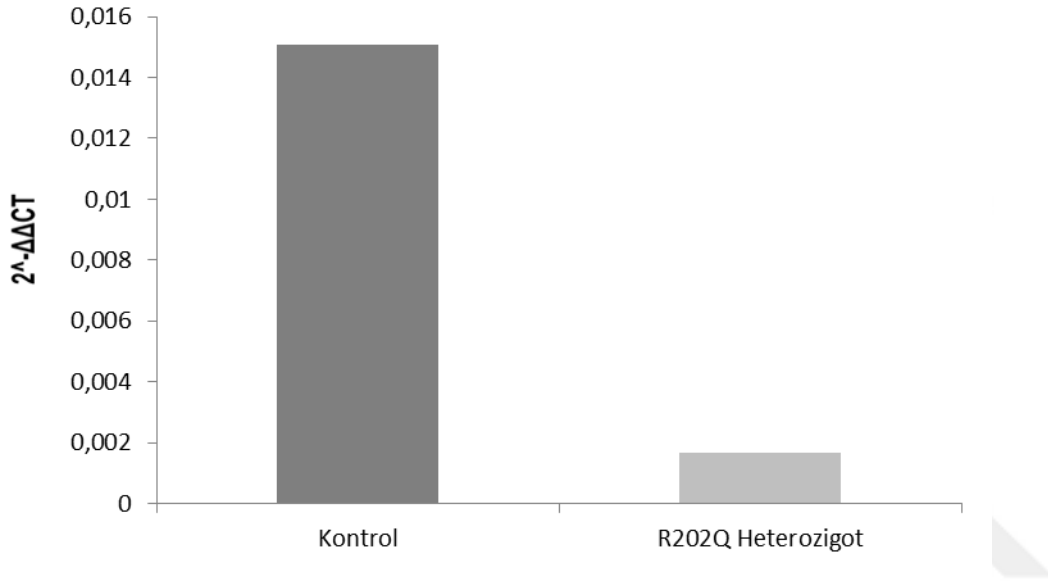
Katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre MEFV geninde R202Q mutasyonu bulunan 22 hasta ile sağlıklı olan ve mutasyonu bulunmayan 8 bireyin (kontrol grubu) gen ifade düzeylerini karşılaştırdığımızda MEFV geninde R202Q mutasyonu bulunan hastaların gen ifade düzeyi düşük olarak tespit edilmiştir. MEFV geninde R202Q mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. MEFV geninde R202Q mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin mutasyonu bulunmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması

4.3.3. R202Q Heterozigot mutasyonunun gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması

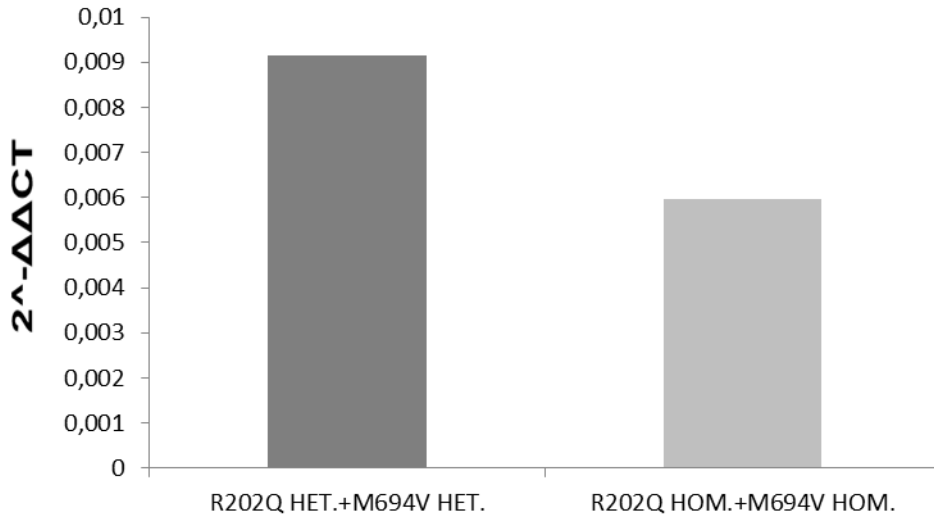
Katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre R202Q heterozigot mutasyonu olan hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun gen ifade düzeylerini karşılaştırdığımızda R202Q heterozigot mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin düşük olduğu tespit edilmiştir. R202Q heterozigot mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. R202Q Heterozigot mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin hasta olmayan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması

4.3.4. R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun gen ifade düzeyinin karşılaştırılması

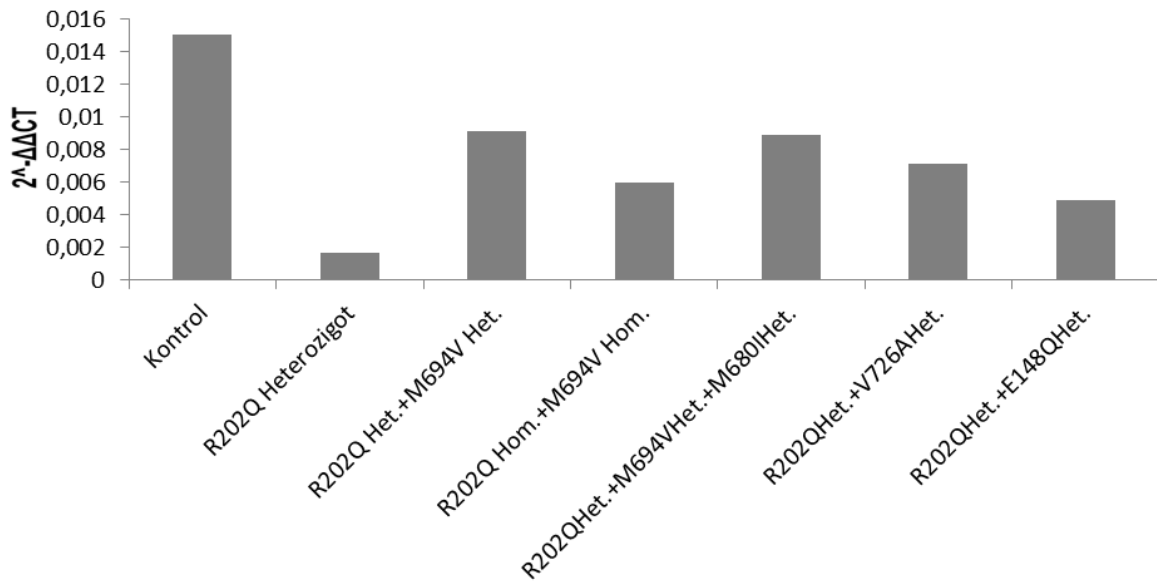
R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun gen ifade düzeyini karşılaştırdığımızda R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun gen ifadesinin düşük olduğu görülmüştür. R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonunun gen ifade düzeyininin kıyaslanması Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q+R202Q/M694V+M694V mutasyonunun gen ifade düzeyinin karşılaştırılması

4.3.5. R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifadesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması

R202Q/0, R202Q/R202Q+M694V/M694V ve R202Q/E148Q heterozigot mutasyonu ile sağlıklı kontrol grubunu kıyasladığımızda gen ifade düzeylerindeki azalmanın fazla olduğu görülmüştür. Birleşik heterozigot genotipte bulunan R202Q/M694V, R202Q/V726A mutasyonları ile kompleks heterozigot genotipte bulunan R202Q/M694V/M680I mutasyonun gen ifade düzeyleri sağlıklı kontrol grubunda düşük olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.8.'de R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifade düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 4.8. R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifade düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz ateşi hastalığı ülkemizde sık olarak görülmesi dolayısıyla üzerinde farklı yönlerden araştırmalar yapılan kalıtsal bir hastalıktır. Şimdiye kadar 363 polimorfizm bildirilmiştir. Ancak bunların klinik belirtiyeye neden olan mutasyon sayısı bildiğimiz kadarı ile 14 dür. Bu polimorfizmler üzerine yapılan çalışmalar da devam etmektedir. Gen dizileme yöntemi ile her geçen gün yeni polimorfizmlerin varlığı bildirilmektedir. Mutasyonun yanı sıra gen ifade düzeyi de burada önem taşımaktadır. Aslında patolojik olanlar ile olmayanların gen ifade düzeylerinin incelenmesinde yarar olduğu da düşünülmektedir. Bu nedenlerle patolojik olduğu kesin olarak ortaya konamayan R202Q polimorfizminin gen ifade düzeyinin ortaya konarak direkt mutasyonlarla kombine veya kompleks olması durumlarındaki gen ifade düzeylerinin ortaya konması önemli olarak görünmektedir. Çünkü toplumlarda görülme sıklığı açısından en önemli polimorfizm olarak karşımıza çıkmaktadır. Son günlerde MEFV genine ait polimorfizm sayısının artmasında dizi analiz yöntemlerinin de önemli katkısının olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar polimorfizm sayısı çok sayıda olsa da bunların hastalıkla ilişkilerinin varlığı ile ilgili oldukça ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bizim bu çalışmada vurgulamak istediğimiz ise R202Q mutasyonunun tek başına ve diğer mutasyonlarla birlikteliğindeki ekspresyon düzeylerinin ortaya konmasıyla R202Q mutasyonunun diğer patolojik mutasyonlara etkisinin varlığının incelenmesiydi. Nitekim R202Q mutasyonunun diğer mutasyonlarla birlikteliğinde ekspresyon düzeylerinin kontrol ve referans gene (GAPDH) oranla düşük olduğu görülmektedir. Bunu da araştırmacılar hastalıkla gen ifade düzeyinin arasında ilişkinin varlığı ile açıklamışlardır (66). Aynı araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada AAA hastalığına ait klinik belirtileri olan ve geninde mutasyon olan hastaların MEFV geni mRNA ifade düzeylerini sağlıklı kontrol grubundan düşük olduğunu tespit etmişlerdir. AAA hastalığında, genotip ile MEFV mRNA ifade düzeyi arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Mutasyon sayısındaki artışa ve mutasyon tipine bağlı olarak MEFV mRNA ifade düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir. (66). Bizim çalışmamızdaki patolojik mutasyonlardaki olan ekspresyon düzeyleri de kontrollere göre düşük bulunmuştur.

Üstek ve ark. (2007), MEFV geninde görülen M694V, M680I, V726A, M694I ve E148Q mutasyonlarını 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 azalabileceğini bildirmişlerdir (31).

Kocazorbaz (2008), tarafından yapılan çalışmada ise M694V homozigot mutasyonu bulunan hastalarda MEFV geni mRNA ifade düzeyinin sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğu gözlenmiştir (67).

Çalışmamızda DNA dizi analizi ile mutasyonları tespit etmemiz bakımından diğer çalışmalardan farklı olarak daha önce bahsedilmemiş olan R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifade düzeylerini inceledik. Diğer çalışmalarda MEFV geninde görülen belirli mutasyonların gen ifade düzeyleri incelenmiş ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda ise R202Q ile M694V mutasyonunun birlikte görülmesi dikkat çekmektedir. Bu durumun nedeni, R202Q mutasyonunun M694V mutasyonu ile cis konumunda bulunması ve birlikte kalıtılmasından kaynaklanmaktadır (8).

Çalışmamızda referans gen GAPDH ile MEFV geninde görülen R202Q mutasyonuna sahip hastaları karşılaştırdığımızda MEFV geninin ifade düzeyi düşük bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile uyumlu olarak MEFV geninde mutasyonu bulunan hastaların MEFV geni ifade düzeyi, sağlıklı kontrol grubundan düşük olduğu homozigot mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin ise heterozigot mutasyonu olanlardan düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da bize homozigot olgularda genin etkileniminin daha fazla olduğunu göstermektedir. R202Q mutasyonunun gen ifade düzeyini birlikte görüldüğü diğer mutasyonlarla karşılaştırdığımızda R202Q heterozigot ve R202Q/R202Q+M694V/M694V mutasyonlarının gen ifade düzeylerinin birleşik heterozigot genotipte olan R202Q/M694V, R202Q/E148Q, R202Q/V726A mutasyonlarından ve kompleks heterozigot genotipte ise R202Q/M694V/M680I mutasyonundan düşük olduğu görülmüştür. Tüm bilgiler irdelendiğinde R202Q mutasyonunun birlikte olduğu heterozigot olgularda, homozigotlara göre beklendiği üzere daha fazla bir ekspresyon düzeyi tespit edilmiştir. Buna karşın tek başına heterozigot R202Q mutasyonlardaki gen ekspresyon düzeyleri Ganiyusufoğlu'nun doktora tezinde de izlendiği üzere kontrollere göre oldukça düşük bulunmuştur (68). Polimorfizm olarak değerlendirilen bu mutasyondaki ekspresyon değerlerini açıklayıcı herhangi bir bilimsel açıklama tarafımızdan getirilememiştir. Bu olgularda sadece incelediğimiz ekzon 2 ve 10 dışında başka ekzonlara ait mutasyon var mıydı bilmiyoruz. Ancak Sadece R202Q heterozigot ve homozigot mutasyonu olan olguların diğer tüm ekzonların da taranmasıyla gerçek anlamda ekspresyon düzeylerinin ortaya konmasıyla bu duruma açıklık getirilebileceği düşünülmektedir. Bu konudaki çalışmalarımızı genişleterek daha ayrıntılı bir şekilde devam edeceğimizi ve soru işaretleri bulunan noktalara uygun yanıtlar bulacağımızı düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak MEFV geninde görülen R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü mutasyonlar incelendiğinde, mutasyonlu olguların sağlıklı kontrol grubuna göre gen ifade düzeyinde azalma olduğu görülmüştür. R202Q mutasyonun birlikte görüldüğü M694V homozigot mutasyonunda gen ifade düzeyi aynı mutasyonları heterozigot olarak bulunduran olgulardan düşük bulunmuştur. Bu durum hasta olan bireylerin genlerinin taşıyıcı olan bireylerden daha fazla etkilendiğini göstermektedir. R202Q heterozigot mutasyonunun gen ifade düzeyinin kontrollere göre oldukça fazla azalmasına tarafımızdan bir açıklama getirilememiş olup, hastaların ekzon 2 ve ekzon 10 dışında kalan diğer ekzonlarında da mutasyon olabilir. Konuya açıklık getirebilmek için daha kapsamlı çalışma yapmayı düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Ben-Chetrit, E., Levy, M. 1998. Colchicine: 1998 Update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 28(1): 48-59.
2. Bakkaloğlu, A. 2003. FamilialMediterraneanfever. *Pediatr Nephrol*, 18: 853-859.
3. Önen, F. 2006. FamilialMediterraneanfever. *RheumatolInt*, 26: 489-496.
4. Ben-Chetrit, E., Touitou, I. 2009. FamilialMediterranean Fever in the World. *Arthritis&Rheumatism*, 61: 1447-1453.
5. Cazeneuve C, Sarkisian T, Pêcheux C, Dervichian M, Ne'delec B, Reinert, ü P, ve ark. MEFV-Gene Analysis in Armenian Patients with Familial Mediterranean Fever: Diagnostic Value and Unfavorable Renal Prognosis of the M694VHomozygous Genotype—Genetic and Therapeutic Implications. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999; 65:88–97.
6. Turkish FMF Study Group. 2005. FamilialMediterranean Fever (FMF) in Turkey Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine*, 84: 1-11.
7. Öztürk C., Halıcioğlu O., Çoker I., Gülez N., Sütçüoğlu S., Karaca N. ve ark. 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.
8. Infevers.2019. <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=1>
9. Yalçınkaya F., Çakar N., Mısırlıoğlu M., Tümer N., Akar N., Tekin M. ve ark. 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.
10. Örün E., Yalçınkaya F. 2003. Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve amiloidoz. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*, 12(1): 1-7.
11. Farivar S., Shiari R., Hadi E. 2010. Molecularanalysis of MEFV gene in Iranian children with Familial Mediterranean fever. *Indian Journal of Rheumatology*, 25: 66-68.
12. Ozalkaya E., Mir S., Sozeri B., Berdeli A., Mutlubas F., Cura A. 2011. Familial Mediterranean fever gene mutation frequencies and genotype-phenotype correlations in the Aegean region of Turkey. *Rheumatol Int*, 31: 779-784.
13. Samuels J., Aksentijevich I., Torosyon Y., Centola M., Deng Z., Sood R. ve ark. 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.
14. Adwan, M.H. 2015. A brief history of familial Mediterranean fever. *Saudi Med. J.*, 36 (9) : 1126-1127.
 15. Ece A., Çakmak E., Uluca Ü., Kelekçi S., Yolbaş İ., Güneş A., ve ark. 2014. The MEFV mutations and their clinical correlations in children with familial Mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatol Int.*, 34:207-212.
 16. Tunca M., Ataca P. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığında son 10 yıl ve Türk araştırmacıların katkısı: Saptamalar ve öneriler. 2013. *RAED Dergisi*, 5(1): 25- 28.
 17. Lidar M., Livneh A. 2007. Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *The journal of medicine*, 65(9): 318-324.
 18. Akar N., Mısıroğlu M., Yalçınkaya F., Akar E., Çakar N., Tümer N., ve ark.1999. MEFV Mutations in Turkish Patients Suffering from Familial Mediterranean Fever. *Hum Mutat*, 15(1): 118-9.
 19. Dodé C., Pêcheux C., Cazeneuve C., Cattan D., Dervichian M., Goossens Delpech M., ve ark. 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.
 20. NCBI. 2019. MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEFV#location>.
 21. Peynircioğlu B.,Yılmaz E. 2006. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının moleküler temeli. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 37: 223-229.
 22. Centola M., Wood G., Frucht D. M., Galon J., Aringer M., Farrell C., ve ark. 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.
 23. 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.
 24. Salehzadeh, F. 2015. Familial Mediterranean Fever in Iran: A Report from FMF Registration Center. *International Journal of Rheumatology*, 2015:1-6.
 25. Akpolat T., Özkaya O., Özen S. 2012. Homozygous M694V as a risk factor for amyloidosis in Turkish FMF patients. *Gene*, 492:285-289.

26. 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.
27. Bernot A., Da Silva C., Petit J. L., Cruaud C., Caloustian C., Castet V., ve ark.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.
28. Mneimneh S., Naous A., Naja Z., Naja A.S., Megarbane A., Rajab M. 2016. Familial Mediterranean Fever: Clinical and Genetic Characteristics among Lebanese Pediatric Population. *Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Diseases*, 6: 63-73.
29. Touitou, I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics* , 9: 473 – 483.
30. Gangemi S., Manti S., Procopio V., Casciaro M., Di Salvo E., Cutrupi M.,ve ark. 2018. Lack of clear and univocal genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever patients: A systematic review. *Clinical Genetics*, 2018: 1-14.
31. Ustek D., Ekmekci C. G., Selcukbiricik F., Cakiris A., Oku B., Vural B.,ve ark. 2007. Association Between Reduced Levels of MEFV Messenger RNA in Peripheral Blood Leukocytes and Acute Inflammation. *Arthritis&Rheumatism*, 56 (1) : 345-350.
32. 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.
33. Balkarli 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.
34. 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.
35. Sonmez H. E., Batu E. D., Ozen S. 2016. Familial Mediterranean fever: current perspectives. *Journal of Inflammation Research*, 9 : 13-20.
36. 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.
37. 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.

38. Livneh A., Langevitz P. 2000. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 14 (3) : 477-498.
39. Padeh S., Berkun Y. 2016. Familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol*, 28:523-529.
40. Sönmezgöz E., Özer S., Gül A., Yılmaz R., Kasap T., Taccı Ş., ve ark. 2019. Clinical and Demographic Evaluation According to MEFV Genes in Patients with Familial Mediterranean Fever. *Biochemical Genetics*, 57: 289-300.
41. Soriano A., Manna R. 2012. Familial Mediterranean fever: New phenotypes. *Autoimmunity Reviews*, 12 : 31-37.
42. Matzner Y.1995. Biologic and clinical advances in familial Mediterranean fever. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 18 : 197-205.
43. Zadeh N., Getzug T., Grody W.W. 2011. Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: Integrating medical genetics in a dedicated inter disciplinary clinic. *Genetics in Medicine*, 13 (3) : 263-269.
44. Pras M. 1998. Familial Mediterranean Fever: From the Clinical Syndrome to the Cloning of the Pyrin Gene. *Scand J Rheumatol*, 27 : 92-97.
45. Shohat M., Halpern G. J. 2011. Familial Mediterranean fever-A review. *Genetics in Medicine*, 13 (6) : 487-498.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.

51. 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.
52. Joshi M., Deshpande J.D. 2011. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1) : 81-97.
53. Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29 : 151-159.
54. Solanki G. 2012. Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2 (3) : 98-102.
55. 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.
56. Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39 (1) : 1-11.
57. Schmittgen T.D., Livak K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc.*, 3 (6) :1101-8.
58. Günel S. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi ‘‘Real- Time PCR’’. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27 : 763-767.
59. 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.
60. 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.
61. Kaltenboeck B., Wang C. 2005. Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. *Advances In Clinical Chemistry*, 40 : 219-249.
62. Seifi M., Ghaemi A., Heidarzadeh S., Khosravi M., Namipashaki A., Soofiany V.M., Khosroshahi A.A., ve ark. 2012. Overview of Real-Time PCR Principles. *Intechopen*, 19 : 405-442.
63. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. 2007. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. ISBN: 978-1-4160-3080-5, USA, 600s.
64. Munshi A. 2012. *DNA Sequencing methods and applications*. ISBN: 978-953-51-0564-0, India, 184s.
65. Ravi I., Baunthiyal M., Saxena J. 2014. *Advances in Biotechnology*. ISBN: 978-81-322-1553-0, India, 264s.

66. 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 famillal Mediterranean fever gene. *Genes and Immunity*, 10:273-279.
67. 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.
68. Ganiyusufoğlu E. Yaygın Görülen MEFV Genine Ait Mutasyonların Gen Ekspresyonlarının Araştırılması. Doktora Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 86s.



8. ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. MEFV geninin 16. kromozomdaki konumu	4
Şekil 2.2. MEFV geninde yaygın görülen mutasyonlar	5
Şekil 2.3. Pysin proteinin yapısı ve mutasyon bölgeleri.....	6
Şekil 2.4. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının patogenezi.....	8
Şekil 2.5. AAA hastalığında görülen klinik belirti ve bulgular. Akut skrotum dışındaki belirtiler cinsiyet ayrımı olmadan gösterilmiştir	10
Şekil 2.6. Çayır safranı (colchicum autumnale) bitkisi	16
Şekil 2.7. Kolşisinin kimyasal yapısı	16
Şekil 4.2. Ekzon 2 bölgesinde görülen R202Q heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü	30
Şekil 4.3. Ekzon 10 bölgesinde görülen M694V heterozigot mutasyonu elektroforegram görüntüsü	30
Şekil 4.4. MEFV geninin ifade düzeyinin referans gen olan GAPDH ile karşılaştırılması ...	36
Şekil 4.6. R202Q Heterozigot mutasyonu olan hastaların gen ifade düzeyinin hasta olmayan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması	37
Şekil 4.7. R202Q/M694V mutasyonu ile R202Q+R202Q/M694V+M694V mutasyonunun gen ifade düzeyinin karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.8. R202Q mutasyonu ve birlikte görüldüğü diğer mutasyonların gen ifade düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması	39

9. ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Tel Hashomer Tanı Kriterleri.....	14
Çizelge 3.1. PCR işlemi aşamaları	22
Çizelge 3.2. Exosap PCR işlemi aşamaları.....	23
Çizelge 3.3. Döngü sekans PCR işlemi aşamaları	24
Çizelge 3.4. Real Time-PCR işlemi aşamaları	26
Çizelge 4.1. Olguların mutasyon tiplerine göre dağılımı	29
Çizelge 4.2. MEFV genine ait cDNA konsantrasyonları ile Ct değerleri	31
Çizelge 4.3. Mutasyonlara göre MEFV geni ve kıyaslama yaptığımız referans gen GAPDH'e ait olan $2^{-\Delta Ct}$ değerleri ile MEFV genine ait katlı oranlar ifade düzeyi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	32

10. EKLER

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	yok		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.03.2017	02	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
	OLGU RAPOR FORMU	yok		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	yok		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama							
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>							
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>							
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>							
	İLAN	<input type="checkbox"/>							
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>							
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>							
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 27	Tarih:29.08.2018	Oturum:2018/15						
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.								
	Kök Hücre, doku nakli, organ nakli ve yeni bir cerrahi yöntem ile ilgili çalışmalar ve geleneksel tıp uygulamaları ile ilgili çalışmalar için ayrıca Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünden izin alınması gerekmektedir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.								
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu								
BAŞKAN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Can ACIPAYAM								
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Başkan Doç. Dr. Can ACIPAYAM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Ahmet Çağrı AYKAN Başkan Yardımcısı Üye	Kardiyoloji	KSU Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sezen KOÇARSLAN Üye	Tıbbi Patoloji	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	DOĞUM İZNI
Doç. Dr. Mete GÜLER Üye	Göz Hastalıkları	KSU Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nacihan BİLAL Üye	Kulak, Burun, Boğaz Hastalıkları	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Dr.Öğr. Üyesi Gözen ÖRSÜZ Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr. Üyesi Aysegül ERDOĞAN Üye	Halk Sağlığı	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr. Üyesi Selma YAMAN Üye	Biyofizik	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Dr.Öğr. Üyesi Nadire ESER Üye	Farmakoloji	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr. Üyesi Adem DOĞANER Üye	Biyostatistik	KSU Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Ecz. Dilara Algül DOKUMACI Üye	Eczacı	Dilara Eczanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğt.Gör. Ahmet KARATUT Üye	Hukukçu	KSU Pazarcık MYO	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Sultan Mehmet YAMAN Üye	Mühendis	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hacı Ömer DOKUMACI Üye	Mühendis	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
SERH(VARSA)									

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç.Dr. Can ACIPAYAM

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

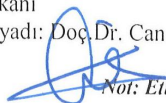
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	MEFV Genindeki R202Q Mutasyonunyalnız Sık Görülen Mutasyonlarla Kombine Ve Kompleks Halinde İken Gen Ekspresyonunun Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	345

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	KSÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı Adres: Kayseri/Kahramanmaraş Yolu Üzeri Avşar Yerleşkesi 46000/ K.MARAŞ
	TELEFON	(0344)3003424
	FAKS	(0344)3003409
	E-POSTA	tipkaek@ksu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Metin KILINÇ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya AD			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ	Yok			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>		
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
	- Rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyaller ile yapılacak araştırma -Kan, idrar ve doku gibi biyokimyasal, mikrobiyolojik ve patolojik materyaller ile yapılacak araştırma - Gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik genetik materyal ile yapılacak araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Can ACIPAYAM
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yeliz DOBOOĞLU
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 28.05.1984 Adana
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0542 542 54 51
e-posta : yeliz_dobooglu@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyokimya AD	2019
Lisans	KSÜ / Fen Edebiyat Fakültesi /Kimya Bölümü	2006
Lise	Özel Ali Kenger Lisesi	2001

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2014	Özel Megapark Hastanesi	Kimyager
2014-Halen	KSÜ Tıp Fakültesi	Kimyager

Yabancı Diller

İngilizce