EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

HEREDİTER OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLARDA ASC GEN MUTASYONLARININ ve mRNA EKSPRESYONUNUN SAPTANMASI

Sinem Melek Nalbantoğlu

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00
Sunuş Tarihi: 01.07.2010

Bornova-İZMİR

2010

Sinem M. Nalbantoğlu tarafından doktora tezi olarak sunulan "**Herediter Otoinflamatuar Hastalıklarda ASC Gen Mutasyonlarının ve mRNA Ekspresyonunun Saptanması**" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.07.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı **: ....**

Raportör Üye **: ....**

Üye **: ....**

Üye **: ....**

Üye **: ....**

ÖZET

HEREDİTER OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLARDA *ASC* GEN MUTASYONLARININ VE mRNA EKSPRESYONUNUN SAPTANMASI

Nalbantoğlu, Sinem Melek
Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Bahattin Tanyolaç
Temmuz 2010, 70 sayfa

Bu çalışmada, herediter otoinflamatuar hastalıklarda bir prototip olan Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF: Familial Mediterrenean Fever: OMIM249100) hastalığında ortaya çıkan farklı fenotiplerin oluşumunda intraselüler adaptör protein olarak bilinen *ASC* (apopthosis-associated speck like protein with a CARD) molekülünün rolü araştırılmıştır. 165 bireyden oluşan çalışma grubumuzda, *MEFV* ve *PYCARD (ASC)* geni mutasyon analizleri ve ‘’*PYCARD*’’ mRNA gen ekspresyonu kantitasyonu gerçekleştirilmiştir. *MEFV* geni mutasyon analizinde; 2, 3, 5 ve 10. ekson mutasyonlarından homozigot, heterozigot, bileşik heterozigot ve *MEFV* geninde major mutasyon saptanmayan klinik olarak şüpheli FMF gruptan oluşan hasta alt grupları oluşturulmuştur. *ASC* geninin tüm kodlayan eksonlarını içeren mutasyon analizinde hiç bir hastada nukleotit değişimi saptanmamıştır. *ASC* geni mRNA ekspresyonu kantitasyonunda, sağlıklı kontrollere relatif olarak FMF hastalarında istatistikî anlamlı ($p<0,004$) ekspresyon artışı görülmüştür.

Bu verilere göre, çalışma grubunu oluşturan Türk FMF hastalarında ASC geni mutasyona uğramayarak, evolüsyoner süreçte hücre içinde merkezi ve adaptör niteliğe sahip korunmuş bir protein olduğunu göstermiştir. *ASC* geni FMF hastaları otoinflamasyonunda önemli bir yere sahiptir ve sorumlu *MEFV* genine modifikatör olarak; hastalığın ortaya çıkışı, klinik seyir ve özellikle major mutasyonu bulunmayan hastalarda fenotipik özelliklerin oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Herediter Otoinflamatuar Hastalıklar, Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), *MEFV, ASC (PY-CARD),* Pyrin.

ABSTRACT

DETERMINATION OF *ASC* GENE MUTATIONS AND mRNA EXPRESSIONS IN HEREDITARY AUTOINFLAMMATORY DISORDERS

Nalbantoğlu, Sinem Melek
PhD in Bioengineering Department
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ
July 2010, 70 pages

In this study, the role of *ASC* (apopthosis-associated speck like protein with a CARD) gene in processing the different phenotypes during the pathogenesis of Familial Mediterranean Fever which is a prototype in hereditary auto-inflammatory diseases was analyzed. In the study group consisting of 165 patients, mutation analysis of *MEFV* and *PYCARD (ASC)* genes and gene expression quantitaion of *PYCARD (ASC)* gene were performed. In the mutation analysis of MEFV gene, patient subgroups were constituted involving homozygous, heterozygous, compound heterozygous and suspicious cases with synonimous and non-synonimous sequence changes relative to mutations taken part in exons 2, 3, 5 and10. We didn't found any sequence change in the whole coding exons of *ASC* gene in 165 individuals. In gene expression quantitation, sytatistically significant *ASC* gene expression fold increases ($p<0,004$) were seen relative to healthy controls.

Our results pointed out the evolutionary role of *ASC* gene which seems to be conserved since neither mutation nor polymorphisms were foumd within exons of this gene. *ASC* gene has significant modificator role relative to *MEFV* gene in FMF patients, and suggesting a role in occurring of the disease, prognosis and phenotypic characterization in particularly for the no-major-mutation group.

Keywords: Hereditary Auto-inflammatory Diseases, Familial Mediterranean Fever (FMF), *MEFV, ASC* (PY-CARD), Pyrin.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında emeği geçen çok değerli tez danışmanlarım sayın Doç. Dr. Bahattin Tanyolaç ve sayın Prof. Dr. Afig Berdeli ile sevgili hocalarım sayın Prof. Dr. Aynur Gürel, Doç. Dr. Sırrı Çam, Doç. Dr. Cemal Ün, Yrd. Doç. Dr. Çağlar Karakaya ile Yrd. Doç. Dr. Levent Şık'a; sayın Prof. Dr. Fazilet Vardar Sukan'a; aileme, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvarı'na ve Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET v
ABSTRACT vii
TEŞEKKÜR ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
GRAFİKLER DİZİNİ xv
1.Giriş 1
2.Literatür Özeti 3
2.1 Herediter Periyodik Ateşler 3
2.2 Periyodik Ateşlerden FMF'de Genel Tarihçe 4
2.3 Genel moleküler mekanizma 7
2.3.1 Patogenez Ve Patofizyoloji 7
2.4 İnflamazom Kompleksi 10
2.5 FMF Tedavisinde Kolşisin Ve Moleküler Mekanizma 16
3. Materyal Ve Method 21
3.1 Çalışma Grubu 21
3.2 Araştırma Parametreleri 21
3.3 Yöntem 22
3.3.1 Major Kriterler 22
3.3.2 Minör Kriterler 22
3.3.3 Tanıyı Destekleyici Kriterler 23
3.3.4 Gönüllülerin Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri 23
3.4 Kan Örneklerinin Toplanması 24
3.5 Periferik Kandan Genomik DNA Ekstraksiyonu 24
3.6 DNA Miktarının Saptanması 25
3.7 DNA Kalitasyonu 25
3.8 MEFV ve ASC Gen Mutasyon Analizi 26
3.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu 26
3.8.2 PCR Koşulları 26
3.8.3 PCR Ürünlerinin Purifikasyonu 27
3.8.4 DNA Dizi Analizi 27
3.9 ASC Gen Ekspresyon Analizi 28
3.9.1 Periferik Kandan RNA Ekstraksiyonu 28

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.9.2 Kandan Total Hücresel RNA Purifikasyonu....28
3.9.3 RNA Miktarının Ölçülmesi....29
3.9.4 Revers Transkripsiyon PCR ile RNA'dan c DNA Sentezi....29
3.9.4.1 c DNA Sentezi....29
3.9.4.2 c DNA Kalitasyonu....29
3.9.4.3 Real Time PCR....30
3.9.4.4 Değerlendirme....30
3.9.4.5 İstatistik Analiz....31
4. Bulgular....32
4.1 DNA Sekans Analizi Bulguları....32
4.2 Gen Ekspresyon Analizi Bulguları....42
4.2.1 PCR Ürünlerinin Doğrulanması....42
4.2.2 m RNA Amplifikasyonu....43
5. Tartışma....47
6. Sonuç....57
7. Öneriler....59
Kaynaklar Dizini....61
Özgeçmiş....69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	INEFEVERS veri tabanında yer alan otoinflamatuar hastalıklar ve şimdiye kadar bulunan sekans varyantları	4
Şekil 2.2.	16. koromozom *MEFV* gen lokasyonu ve pyrin proteini domainleri	6
Şekil 2.3	MEFV eksonları ve sık gözlenen mutasyonlar	9
Şekil 2.4	Pyrin proteininin etki ettiği hastalık patogenezi temel moleküler yolağı	10
Şekil 2.5.	ASC proteini domainleri	11
Şekil 2.6.	Genel İnflamazom Kompleksi.	12
Şekil 2.7.	NLR protein ailesi domain yapısı	13
Şekil 2.8.	İnflamazom kompleksinin eksojen tehlike sinyalleri ile aktive hale Getirilmesi	14
Şekil 2.9.	İnflamazom aktivasyonu	15
Şekil 2.10.	Kolşisinin elde edildiği çiğdem çiçeği	16
Şekil 2.11.	Kolşisin hareket mekanizmasına dair geliştirilmiş mekanizma	18
Şekil 2.12.	Kolşisine maruz bırakıldığında, supresyona veya indüksiyona uğradığı gözlenmiş gen grupları	20
Şekil 4.1.	p.M694V missense homozigot mutasyonu (ATG/GTG; c.2080A/G)	32
Şekil 4.2.	p.M694V missense heterozigot mutasyonu(ATG/GTG; c.2080A/G)	32
Şekil 4.3.	p.M680IG-C missense heterozigot mutasyonu (ATG/ATC: c.2040G/C)	33
Şekil 4.4.	p.V726A missense heterozigot mutasyonu (GTT/GCT: c.2177T/C)	33
Şekil 4.5.	p.M680I-V726A bileşik heterozigot mutasyonu sekans Elektroforegramı	34
Şekil 4.6.	p.K695R missense heterozigot mutasyonu (AAG/AGG: c.2084A/G)	34
Şekil 4.7.	p.P369S missense heterozigot mutasyonu (CCC/TCC/CCT: c.1105C/T)	35
Şekil 4.8.	p.R408Q missense heterozigot mutasyonu (CGG/CAG: c.1223G/A)	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.9. p.D102D homozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GAT-GAC: c.306T/C) 36

Şekil 4.10. p.G138G heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GGA-GGG:c.276A/G)..... 36

Şekil 4.11. p.A165A heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GCC-GCA: c.330C/A) 37

Şekil 4.12. p.R202Q heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (CGG-CAG: c.605G/A) 37

Şekil 4.13. p.R314R heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (CGC-CGT:c.942C/T) 38

Şekil 4.14. p.E474E (GAA/GAG:c.1422A*G) ve p.Q476Q (CAG*CAA: c.1428G/A) heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) 38

Şekil 4.15. p.D51OD heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GAT*GAC: c.1530T/C) 39

Şekil 4.16. p.E148Q missense heterozigot mutasyonu (GAG-CAG: c.442G/C) 39

Şekil 4.17. p.E148Q missense homozigot mutasyonu (GAG-CAG: c.442G/C) 40

Şekil 4.18. p.A744S missense heterozigot mutasyonu (GCC-TCC:c.2230G/T) 40

Şekil 4.19. ASC geni ekson 1 sekans elektroforegramı 41

Şekil 4.20. ASC geni ekson 2 sekans elektroforegramı 41

Şekil 4.21. ASC geni ekson 3 sekans elektroforegramı 42

Şekil 4.22. cDNA ile gerçekleştirilen PCR analizi jel konfirmasyon elektroforez görüntüsü 43

Şekil 4.23. Heterozigotlar ve bileşik heterozigotların mRNA ekspresyonu 43

Şekil 4.24. Şüpheli grup ve polimorfizmli grupların mRNA ekspresyonu....44

Şekil 4.25. Sağlıklı grup ve homozigotların mRNA ekspresyon düzeyleri 44

Şekil 4.26. Heterozigotlar ve sağlıklı grup mRNA ekspresyon düzeyleri 45

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1. Hasta gruplarının sağlıklı gruba relatif olarak mRNA ekspresyonu kat değişimi 46

1. GİRİŞ

Herediter otoinflamatuar hastalıklar, herhangi bir patojen uyarısı olmaksızın ortaya çıkan inflamatuar olaylar sonucu, yineleyen yangısal ataklar ile belirginleşen bir grup hastalıklar toplamıdır. Otoinflamatuar hastalıkların temel komponenti; abdomen, muskuloskeletal sistem ve deriyi içeren fokal organ klinik inflamasyonunun aralıklı nöbetlerle karakterize edilen herediter periyodik ateşler grubudur. Bilinmeyen bir uyarı tarafından ve herhangi otoimmün işaret olmadan tetiklenen periyodik inflamasyon, bu bozuklukların sürmekte olan anahtar özelliği iken; ateş her zaman mevcut olmayabilmektedir. Hayat boyu devam eden tekrarlı inflamatuar atakların dışında, bu sendromların, hastada başlangıç yaşı, atakların sürekliliği, eşlik eden semptomlar, prognoz ve etnik köken gibi ayırıcı özellikleri vardır (Hoffman, 2007; Grateau, 2006).

Bu hastalıklar, adaptif immün yanıt bozukluluğuna ait herhangi bir kanıt olmadan doğal immün yanıtın primer disfonksiyonu ile oluşmaktadır. Doğal immün sistem anomalileri, lipopolisakkarit ve peptidoglikan gibi patojenler ile ilişkili moleküler düzenlenmelere (PAMPs) verilen anormal, sapmış cevaplar ile kan ve dokularda göze çarpan ciddi nötrofili ve inflamatuar sitokin veya onların reseptörlerinin (IL-1B, TNF-a) disregülasyonunu içermektedir (Galeazzi et al., 2006).

Bu bozuklukların moleküler temelinin aydınlatılması, sistemik ve doku inflamasyonunun hastalık patofizyolojisinin artan bir kavrayış ile anlaşılması ve aynı zamanda yeni, patolojik olmayan doğal immün mekanizmaların ortaya çıkışını sağlayacaktır. Ailesel Akdeniz Ateşi, herediter otoinflamatuar hastalıklarda bir prototiptir. Bu çalışmada, Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF: Familial Mediterrenean Fever: OMIM249100) hastalığında ortaya çıkan çok farklı fenotiplerin oluşumunda intraselüler adaptör protein olarak bilinen *ASC* (apopthosis-associated speck like protein with a CARD) molekülünün rolü araştırılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada MEFV ve ASC mutasyonlarının Pyrin-ASC etkileşimini değiştirmesi ile FMF hastalığında farklı fenotipleri açıklamak ve gen

ekspresyonu mekanizmasına açıklık getirebilmek; ASC proteini mRNA ekspresyonunun bu etkileşimde nasıl rol aldığını ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu çalışma ile erişilmek istenen sonuç, otoinflamatuar hastalıklar için bir prototip oluşturan FMF hastalığında sorumlu bulunan MEFV geni yanı sıra PYCARD gen mutasyonlarının gösterilmesi, PYCARD geni mRNA ekspresyonlarının saptanması ve bunların MEFV gen mutasyonları ile korelasyonlarının gösterilmesi, tedaviye yanıtın farklılığının nedenlerinin açıklanabilmesi, şüpheli FMF hastası olarak gen analizi yapılan ve mutasyon saptanmayan hastalarda patogenezin anlaşılması ve dünya literatürüne yeni bir katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

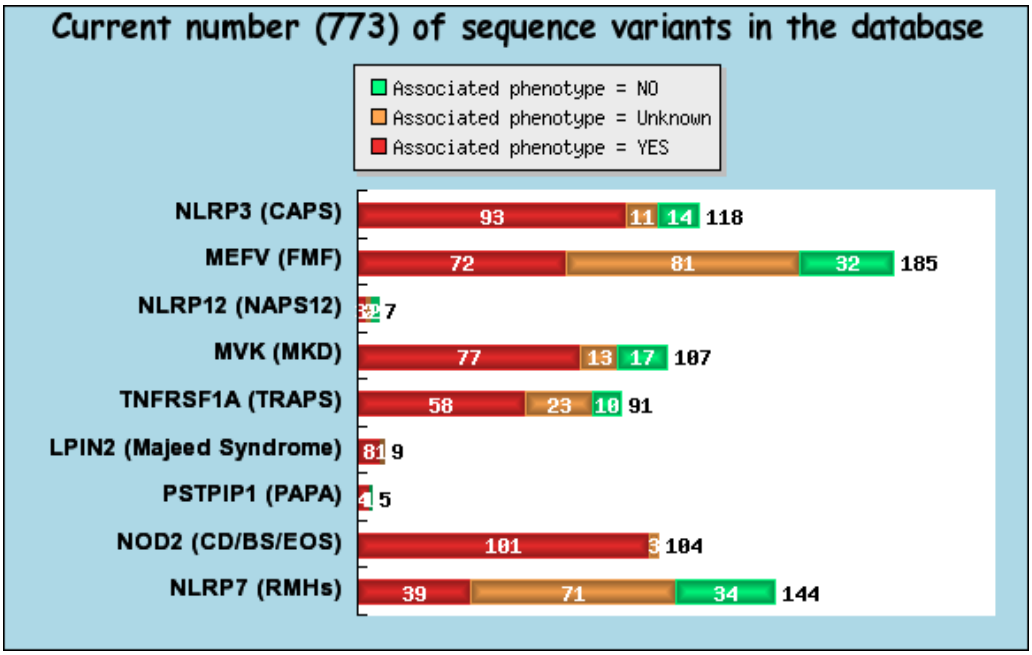
2.1. Herediter Periyodik Ateşler

Monogenik otoinflamatuar sendromların spektrumu, hastalığın altında yatan genetik mekanizmalarının anlaşılması ve hedef tedavilerin kullanılması, eksojen ve endojen tehlike sinyallerinin ve bu uyarıya verilen inflamatuar cevabın tanınması ile başarılacaktır. Mendeliyan tipi kalıtım kalıbına sahip bu inflamatuar hastalıkların altında yatan genetik bozukluklar, her bir tip için spesifik bulunmuş mutasyonlar olup, doğal immünitede yer alan çeşitli proteinleri içermektedir. *Herediter periyodik otoinflamatuar sendromlar;*

1. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF, MIM.249100)
2. Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü ile İlişkili Periyodik Sendrom (TRAPS, MIM.142680)
3. Hiper immünglobülin D Sendromu (HIDS, MIM.260920)
4. Periyodik ateş, aftöz stomatit, farenjit, servikal adenit sendromu (PFAPA sendromu veya Marshall's Sendromu, MIM154780)
5. Pyogenik Steril Artrit, Pyoderma Gangrenosum, akne (PAPA, MIM.604416)
6. Blau Sendromu (MIM186580)
7. Ailevi Soğuk Otoinflamatuar Sendrom (FCAS, MIM.120100)
8. Muckle-Wells Sendromu (MWS, MIM.191900)
9. Yenidoğan Başlangıçlı Multisistem İnflamatuar Hastalık (NOMID, MIM.607115) veya Kronik İnfantil Nörolojik Kutanöz ve Artiküler Sendrom (CINCA)

INFEVERS veritabanı, 2002 yılında kurulmuş ve araştırıcılar için, periyodik ateş sendromları ile ilişkilendirilen tüm sekans varyantları hakkında merkezi bilgi kaynağına giriş sunmaktadır. Sitenin güncel versiyonu 'ISSAID', 8 geni içermektedir. Mevcut 6 gen; MEFV, MVK, TNFRSF1A, NLRP3, NOD2, PSTPIP1 olmakla birlikte yeni eklenen 2 gen; LPIN2 ve NLRP7'dir. INFEVERS 'ISSAID' veritabanı (şekil 2.1), ilişkili genler dâhilinde 540 sekans varyantının

üzerinde içeriğe sahiptir (Milhavet ve ark., 2008). Türk FMF hastalarda saptanan 9 adet MEFV gen mutasyonu INFEVERS'e kayıt edilerek Türk ve dünya literatürüne kazandırılmıştır.



Şekil 2.1. Touitou, I. INEFEVERS veri tabanında yer alan otoinflamatuar hastalıklar ve şimdiye kadar bulunan sekans varyantları (Internet Fevers; http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers).

Bu hastalıklarda gösterilen genlerin kodladıkları protein ürünleri, doğal immünite ve apoptozda yer alan belli bölgeleri paylaşırlar. Periyodik otoinflamatuar sendromlar, apoptoz veya NF-kB sinyalizasyon yolakları için gerekli olan protein-protein interaksiyonlarında yer alan bir ölüm domaini, ölüm efektör domaini ve/veya CARD içeren moleküllerdeki mutasyonlar ile oluşur. Bunlar; TRAPS'ta TNF reseptör Tip1 (TNFRSF1A), FMF'te Pyrin, CINCA'da Cryopyrin ve Blau Sendromda NOD2/CARD15 NACHT domainidir.

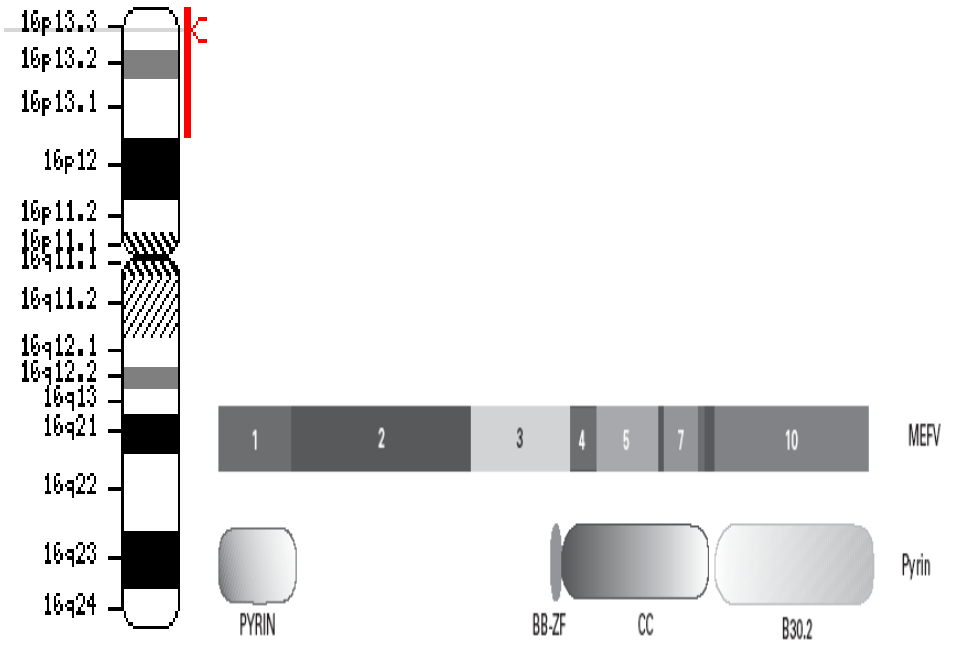
2.2. Periyodik Ateşlerden FMF'de Genel Tarihçe

Mendelyan kalıtım kalıbına sahip olarak FMF'den sonra 1999 yılında tanımlanmış olan bu grup hastalıkların en önemli özelliklerini akut ve genelleştirilmiş kısa ataklar halindeki serozal, sinoviyal ve kutanöz inflamasyon ile karakterize abdominal ağrı ve ateş semptomları oluşturmaktadır (Kasapçopur

ve Arısoy, 2006). İlgili geni ilk tanımlanan, yaygın olarak en sık görülen ve en uzun zamandır bilinen herediter periyodik ateş sendromu veya herediter otoinflamatuar hastalık Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF; AAA)'dir. FMF, kalıtsal otoinflamatuar bozukluklarda bir prototiptir (The French FMF Cons., 1997; The Int FMF Cons., 1997; Stojanov and Kastner, 2005).

Ailesel Akdeniz Ateşi'nin dünya ve Türkiye'deki tarihçesine bakıldığında, binlerce yıldır Anadolu, Kafkaslar ve Ortadoğu'da var olmasına karşın 1945 yılına kadar tanımlanamamıştır. Etnik tercih gözlenen FMF'de sıklıkla Türkler, Yahudiler, Ermeniler ve Araplar etkilenmektedir. Ancak son dönem de kurucu etki varlığında hastalık Avrupa ve Japonya'da da gözlenmiştir (Yoshida et al., 2003).

AAA'nın klinik bulguları ya da benzer tipik semptomlarla ilk kez 1908 yılında Janeway ve Rosenthal tarafından tekrarlayan ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan 16 yaşındaki bir çocuğun bildirilmesi ile karşılaşıldığı kabul edilmektedir. 1945 yılında Siegal tarafından kendisinde ve 10 Aşkenazi Yahudisi'nde benzer şikâyetlerin olması üzerine, bu olgular tartışılmış ve 'benign paroksismal peritonit' adı ile ayrı bir klinik tablo olarak tanımlanmış ve yayınlanmıştır. Sonraları ise Sohar ve Heller'in çalışmaları ile hastalığın pek çok ileri yönü ortaya konmuştur (Siegal et al., 1945; Dewalle et al., 1998). Hastalık 1946 yılından başlayarak tıbbi literatüre girmiş, 1950'lerde AA tipi ("sekonder") amiloidoza yol açtığı anlaşılmış, Mamau ve Kattan tarafından 1951'de genetik geçişi ve amiloidozla ilişkisi gösterilmiştir. 1992 yılında Pras ve ark., Ailevi Akdeniz Ateşi'ne yol açan genin 16. kromozomun kısa kolunda olduğunu saptamışlardır. 1997 yılında Uluslar arası AAA grubu ve Fransız AAA grubu adında iki bağımsız grup, 16p13.3'de yerleşik olan bu genin pozisyonel klonlama tekniği ile moleküler dizisini ve bu gen tarafından kodlanan proteinin (pyrin/marenostrin) (The International FMF Consortium, 1997; French FMF Consortium, 1997) eşzamanlı olarak keşfiyle daha da ilgi çeken bir hastalık haline gelmiştir (şekil 2.2).



Şekil 2.2. 16. koromozom *MEFV* gen lokasyonu ve pyrin proteini domainleri (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Apoptosisde rol alan ölüm domainlerine pyrin proteinindeki yapısal benzerliklerin saptanması sonucu, kimi yönlerden AAA'ya benzer şekilde yineleyen inflamasyonlarla seyreden bazı hastalıklarla birlikte "otoinflamatuar hastalıklar" grubuna katılmıştır (Erken, 2006). Hastalık için geçmişte 'periyodik ateş', 'periyodik hastalık', 'benign paroksismal peritonit', 'periyodik peritonit', 'familial paroksismal poliserözit' isimleri kullanılmış olsa da günümüzde 'Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterrenean Fever) ismi kullanılmaktadır (Doğanavşargil vd., 2003). Hastalığın epidemiyolojik incelemelerinde Yahudiler, Ermeniler, Araplar ve Türkler gibi Akdeniz orijinli populasyonlarda yaygın olarak görülen bir herediter otoinflamatuar hastalık olduğu için bu ismi aldığı anlaşılmıştır (Heller et al., 1958; Touitou, 2001).

2500 yıllık geçmişi olan hastalığın dünya genelinde yaklaşık 150.000 kişiyi etkilediği düşünülmektedir (Haghighat et al., 2006). T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, dünyadaki 150 000 ailevi Akdeniz Ateşi hastasının ağırlıklı olarak Sivas merkez olmak üzere 60 000 kadarı Türkiye'de bulunmaktadır. Yunanistan, İtalya, İspanya, Lübnan, Japonya ve Avusturya'da da hastalık mevcuttur. Portekiz,

Çin, Afganistan, Mısır ve Macaristan kökenli olgu bildirimleri de görülmüştür (Yoshida et al., 2003).

2.3. Genel Moleküler Mekanizma

2.3.1. Patogenez Ve Patofizyoloji

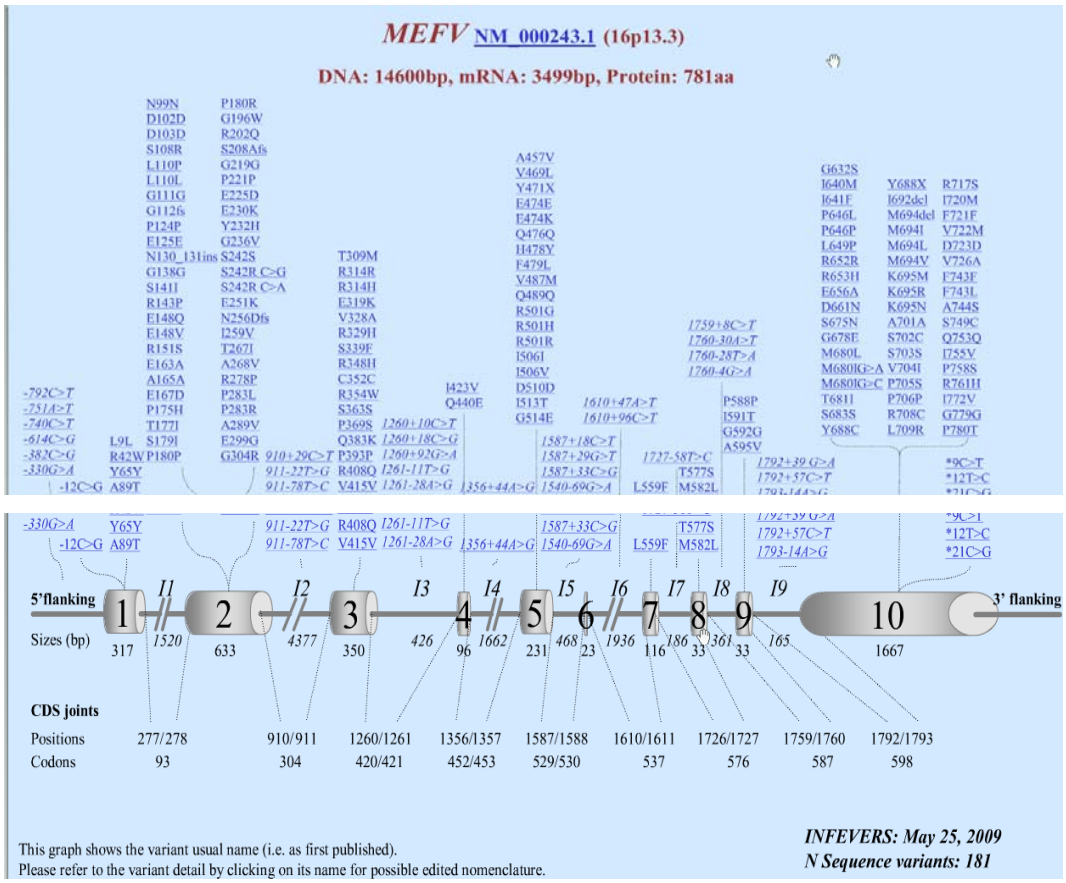
Türkiye'de hastalık prevalansı 1:1075'tir (Yılmaz vd., 2001). Türkler'de taşıyıcılık frekansı 1:5 olarak bildirilmiştir. Vakalar ülke genelinde yaygınsa da son çalışmalar Doğu ve Kuzey Anadolu kökenli hastaların daha çok olduğunu bildirmektedir (Tunca vd., 2005).

MEFV geni 10 ekson ve 9 intron içeren cDNA'sı 3505 nükleotid uzunluğunda, 781 aminoasitlik bir proteini kodladığı belirlenmiştir (Touitou, 2001). *MEFV* geninin kodladığı bu proteine Uluslar arası AAA Grubu Yunanca ateş anlamına gelen ''pyrin'', Fransız AAA Grubu ise Latince Akdeniz anlamına gelen ''Marenostrin'' adını vermişlerdir. Shohat ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada, bu proteinin sistemik lupus ve Sjögren sendromunda görülen otoantijenik bir ribonükleoproteini de içeren iki antiinflamatuar protein ile analog olduğunun saptanmasıyla, proteinin Ro-Ret nükleer faktörler protein ailesinin bir üyesi olduğu bildirilmiştir (The Int. FMF Cons., 1997; French FMF Cons., 1997).

AAA hastalığında fenotip ile genotip arasındaki ilişki farklı etnik gruplarda farklılık göstermekte ve çok tartışmalı yorumlar içermektedir. AAA hastalığında, kompleks alleller, modifiye edici lokuslar, genetik heterojenite ve olası epigenetik faktörler dolayısıyla fenotip ile genotip arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır. MEFV dışındaki genler lokus heterojenitesi sunarak FMF'e benzer klinik görünümden sorumlu olabilirler (Touitou, 2001).

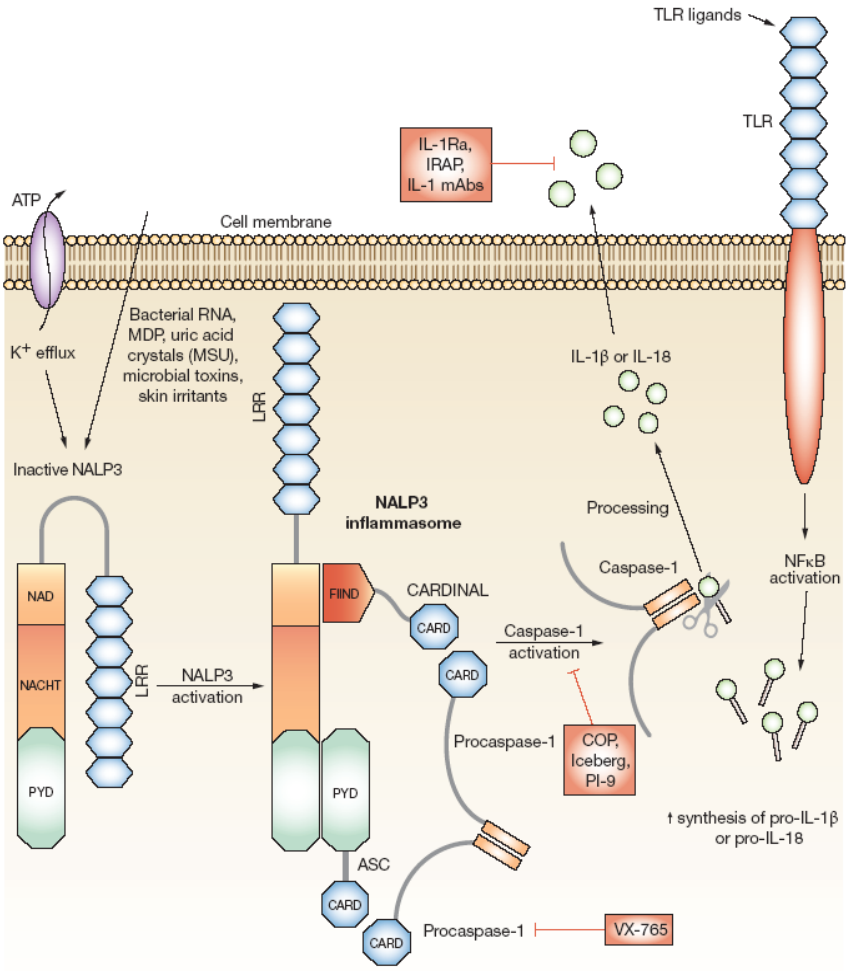
FMF'te gözlenen klinik heterojenite, kısmen de genetik heterojeniteye dayanmaktadır. Hastalığın şiddeti hasta genotipinde var olan mutant allel kombinasyonuna temel olarak bağımlıdır. Gen içi veya dışındaki ek alleller kronik

komplikasyonları arttırarak veya engelleyerek fenotipin ileri modifikasyonlarını sağlamaktadır. Genin mutasyonel sıcak noktaları içinde lokalize olmuş iki mutasyonu içeren genotipler ciddi fenotipler ile ilişkilendirilirken; hafif seyreden fenotipler, E148Q gibi en hafif ve en az penetrant olan diğer bazı mutasyonlar ile ilişkilendirilmektedir. Yapılmış olan deneysel ve klinik çalışmalardan anlaşıldığı üzere, ekson 10'da 680 ve 694 kodonlar arasındaki küçük bölgede ortaya çıkan mutasyonlar yüksek penetrans ve FMF oluşum ve prezentasyonu üzerinde ciddi etkiye sahip iken, V726A, P369S or E148Q genotipleri düşük penetrans ve düşük amiloidoz riski ile ilişkilendirilmektedir (şekil 2.3). Birçok grup, M694V mutasyonunun hastalığın daha ciddi formu ile ilişkili ve homozigot formda M694V mutasyonu taşıyan hastaların amiloid geliştirme risklerinin yüksek olduğunu ileri sürmektedir. E148Q ve V726A mutasyonlarının düşük penetranslı ve amiloidoz geliştirme riskinin düşük olduğu düşünülmektedir. Fakat bazı araştırıcılar, V726A/M680I, M694I/M694I ve V726A/V726A gibi mutasyonlara sahip hastalarda da amiloid geliştiğini rapor etmişlerdir. E148Q mutasyonu, hastalığa yol açıcı bir mutasyondan ziyade bir sekans varyantı olarak düşünülmüştür. Bu mutasyon, hasta fenotipini bazı tanımlanmamış genetik ve epigenetik koşullar altında etkileyebileceği için fonksiyonel bir polimorfizm olarak tasarlanmıştır (Ben-Chetrit et al., 2000).



Şekil 2.3 *MEFV* eksonları ve sık gözlenen mutasyonlar (Touitou, I. Internet Fevers; http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers).

Pyrin proteininin AAA hastalığındaki fonksiyonu çalışmaları halen devam etmekle beraber inflamasyonda direkt veya indirekt bir ‘’down regülatör’’ görevi ve bir transkripsiyon faktörü olarak proinflamatuar faktörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive ederek işlev gösterdiği düşünülmektedir. Pyrinin intrasellüler ortamda PYD domaini içeren komşu proteinlerle özellikle de ASC proteini ile (apoptosis-associated speck-like protein-PYCARD) ilişkili fonksiyonunun anlaşılmasıyla sadece AAA patogenezi değil aynı zamanda genel inflamasyon oluşum mekanizmasına açıklık getirecektir (şekil 2.4).

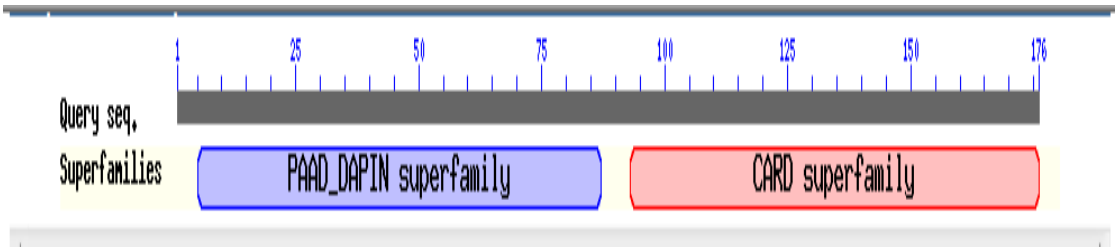


Şekil 2.4 Pyrin proteininin etki ettiği hastalık patogenezi temel moleküler yolağı. (Church LD et al, 2007).

2.4. İnflamazom Kompleksi

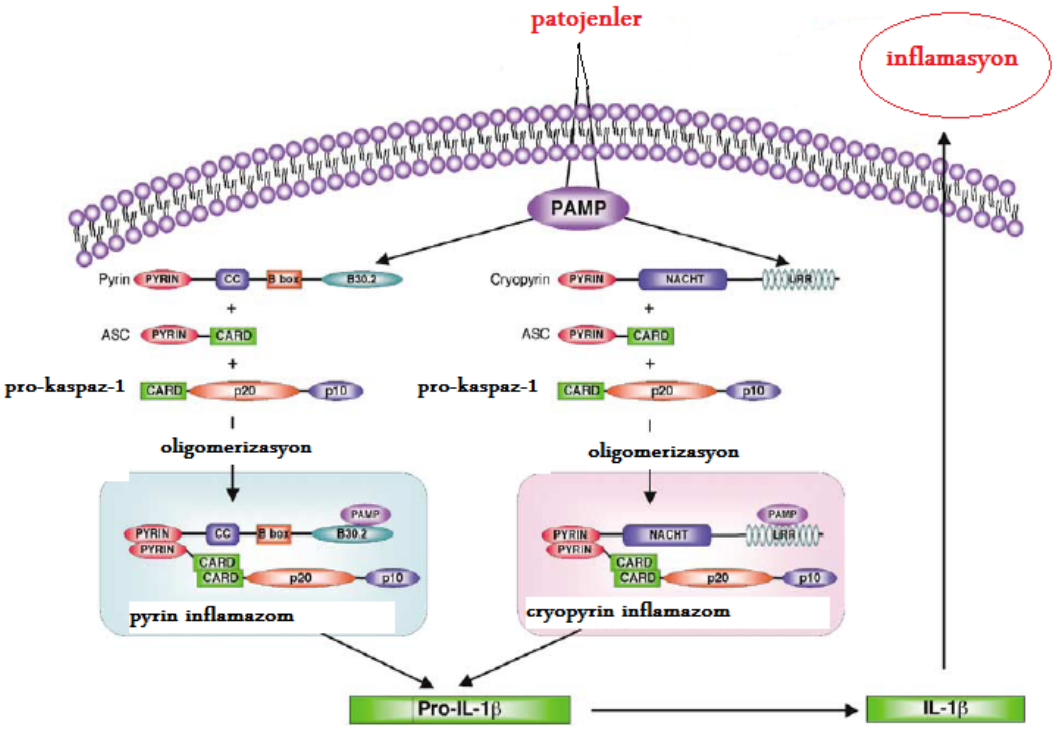
ASC geni, 16p12-p11.2 kromozom bölgesinde haritalanmıştır. Bu gen için, farklı izoformları kodlayan 2 transkript varyantı bulunmuştur (Masumoto et al., 1999). ASC geni, iki protein-protein etkileşim bölgesinden oluşan 195 aminoasitlik bir adaptör proteini kodlar: bir N terminal PYRIN domaini ve bir C terminal kaspaz harekete geçirme domaini CARD'dır. Gumucio ve arkadaşları tarafından 2002 yılında ASC, ilk olarak apoptotik hücrelerde 'speck' şeklinde ifade edilen agregatların oluşumuna sebep olan protein olarak tanımlanmıştır (şekil 2.5). ''Speck'' oluşturan hücrelerin %100'ü apoptotik programı tamamlamaktadır. PYD ve CARD domainleri, kaspaz aktivasyonu ile inflamatuar ve apoptotik sinyalizasyon yolaklarındaki büyük sinyal komplekslerini yöneten 6α helix bağlı ölüm domaini kıvrımı süper ailesinin üyeleridir. Normal hücrelerde, bu

protein sitoplazmaya lokalizedir; ancak apoptoza giden hücrelerde, çekirdeğe yakın bölgelerde kendi üzerine asosiasyonu ile oluşturduğu ‘’speck’’ olarak ifade edilen büyük sitozolik agregatlar halindedir (Schaner et al., 2005; Peynircioğlu, 2006).



Şekil 2.5. *ASC* proteini domainleri (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

2000 yılında Centola ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ASC’nin PyD domaini sayesinde, diğer PyD içeren proteinlerle protein-protein etkileşimine katıldığı gösterilmiştir. CARD domaini ise ASC’nin, fonksiyonel aktivitesinde önemli olduğu bilinen domainidir. Gumucio ve arkadaşları, ASC’nin üç önemli hücresel işlemde; apoptoz, IL-1β’nın işlenmesi ve salgılanması ile ilişkili prokaspaz-1’in oluşturulması ve aktivasyonu, inflamatuar cevabın başlaması ve yayılmasında görevli bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB aktivasyonunda rol oynadığını göstermiştir (şekil 2.6). İnflamazom çalışmalarında hücresiz sistemde endojen seviyede ASC’nin uzaklaştırılması sonucunda kaspaz-1 ve kaspaz-5 aktivasyonunun durması ile apoptoz engellenmiştir (Martinon et al., 2002).

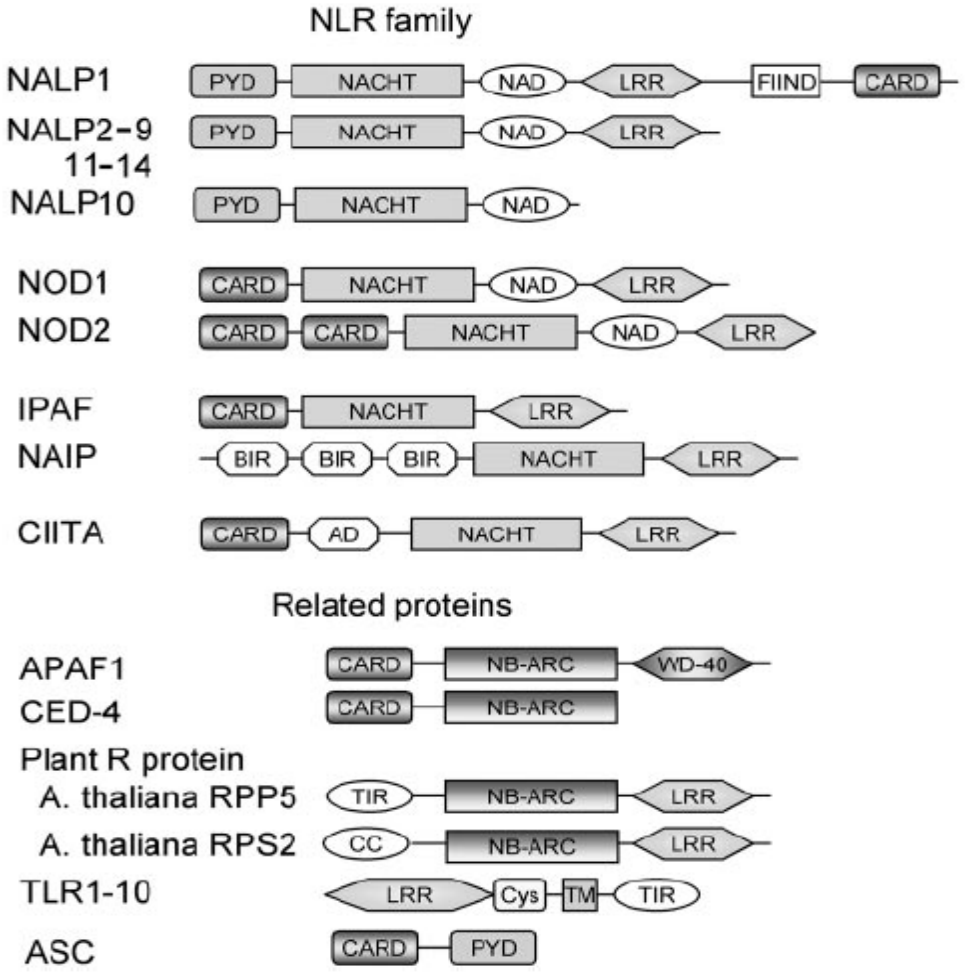


Şekil 2.6: Genel İnflamazom Kompleksi. Patojen enfeksiyonuna cevap olarak PAMP'ların proteinlerin LRR ve B30.2 domainleri ile tanınması ardından ASC ve prokaspaz1 oligomerizasyonu gerçekleştirilir. İnflamasyon uyaranı (bakteriyal LPS, vs.) ile inflamazomlar, CARD domaini vasıtası ile iki molekül pro-kaspaz-1'i (IL-1β-dönüştürücü enzim) bir araya getirerek otokatalizine ve ardından kaspaz-1'in aktif katalitik P10 ve P20 bölgelerinin salıverilmesine yol açarlar. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1B'dan IL-1B yapımını sağlar ve salgılanan IL-1ve apoptozu inhibe eden diğer sitokinlerin oluşumuna yol açan kaskadın indüksiyonu sonucunda, bu sitokinlerin enfekte hücreden serbestleşip kendi reseptörlerine bağlanmasıyla inflamasyon başlamaktadır (Yu J-W et al., 2006).

Hızlı doğal immün cevabı arttırmak için, ASC; birçok patojene ve genotoksik strese karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan TLR-2 ve 4 bağımlı sinyalizasyon yolağı ile düzenlendiği gösterilmiştir (Masumoto et al., 2006; Turul ve Ersoy, 2004).

ASC'nin ''inflamazom'' denilen makromoleküler komplekslerde toplandığı gösterilmiştir. İnflamazom kompleksinde yer alan proteinler temel olarak NLR (mammalian nucleotide-binding oligomerization domain; NOD-like receptor, NLR) protein ailesine aittirler (şekil 2.7). İnflamasyon için bir uyarıcı

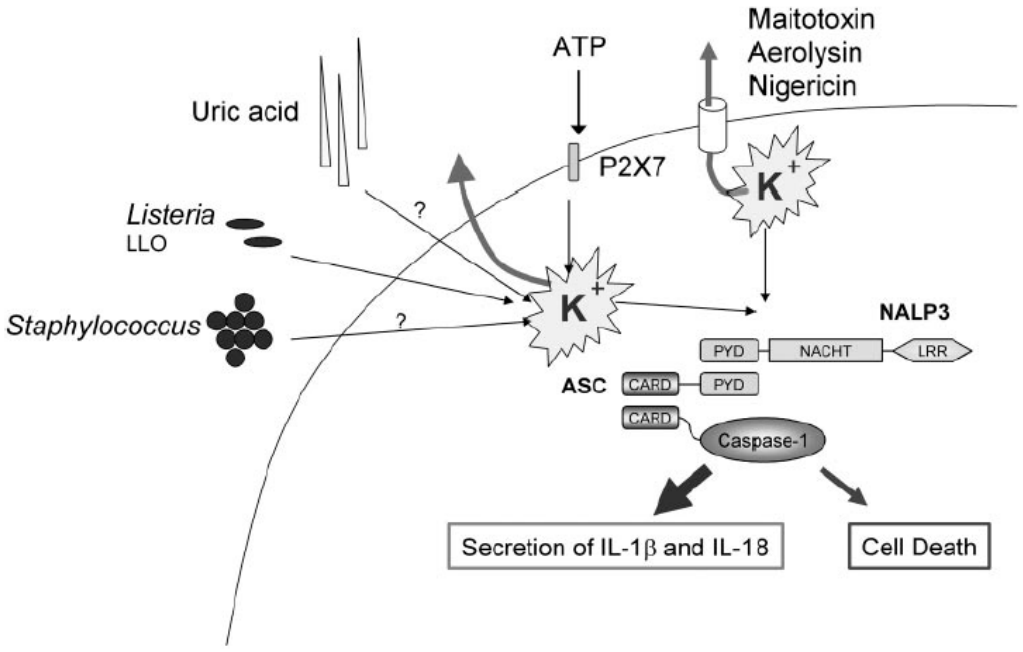
olduğunda, inflamazomlar, CARD domaini vasıtası ile iki molekül pro-kaspaz-1'i (IL-1β-dönüştürücü enzim) bir araya getirerek otokatalizine ve ardından kaspaz-1'in aktif katalitik P10 ve P20 bölgelerinin salıverilmesine yol açarlar. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1B'dan IL-1B yapımını sağlar ve salgılanan IL-1ve apoptozu inhibe eden diğer sitokinlerin oluşumuna yol açan kaskadın indüksiyonu sonucunda, bu sitokinlerin kendi reseptörlerine bağlanmasıyla inflamasyon başlamaktadır (şekil 2.8; 2.9). Ancak pyrin, ASC pyrin domaini ile interaksiyon yaparsa, ASC- prokaspaz ile interaksiyona giremez.



Şekil. 2.7. NLR protein ailesi domain yapısı (Sutterwala et al., 2007).

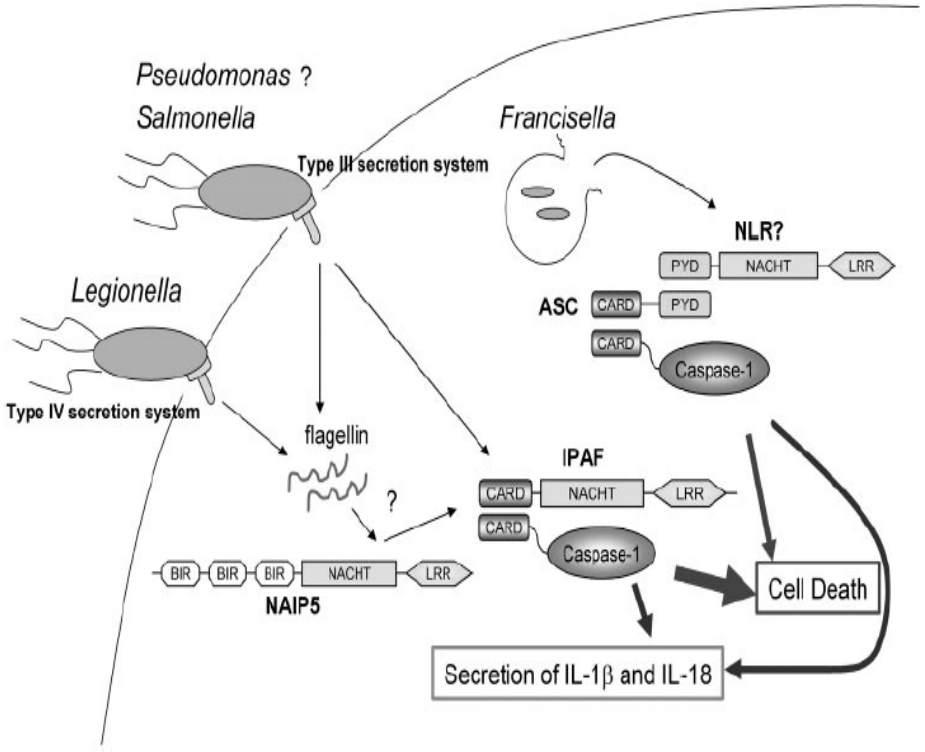
Böylece IL-1β üretimi inhibe edilir ve normal apoptoza izin verilir. Mutasyon dolayısıyla FMF hastaları pyrin kodlayan defektif gene sahip olduğu için pyrin, ASC ile çok zayıf bir şekilde interaksiyona girer ve onun prokaspaz ile reaksiyona girmesine izin vererek, IL-1β üretimine, apoptoz inhibisyonuna ve

inflamasyon patlamasının artışına yol açar. ASC proteininin pro-kaspaz-1'den ayrılması gerçekleşmeyecek ve sürekli kaspaz-1 yapımı ve aktif IL-1B yapımı söz konusu olacaktır. Buna ''apoptoz inhibisyonu'' hipotezi denilmiştir (Tunca vd., 2003; Mc.Dermott, 2004; Kobayashi, 2005). Pyrin'in ASC için yarışmalı inhibisyonu ile inflamazom aktivitesinin negatif regülasyonu görülmüştür. Bu durumda pyrin'in IL-1B üretimini, kaspaz 1 toplanmasını engelleyerek veya kaspaz 1 aktivitesinin direkt olarak nötralize ederek regüle ettiği düşünülmüştür (Church et al., 2008).



Şekil 2.8. İnflamazom kompleksinin eksojen tehlike sinyalleri ile aktive hale getirilmesi (Sutterwala et al., 2007).

Otoinflamatuar hastalıklarda gözlenebilen intraselüler proteinlerdeki olası mutasyonlar ve sonuçta oluşan apoptotik defekt, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna yol açarak inflamatuar polimorfonükleer lökosit hücrelerinin serozal dokulara göçüne sebep olabilir. AAA etyopatogenezinde inflamasyonun rolü üzerinde yapılan çalışmalarda akut atak bölgelerinde en sık rastlanan inflamatuar hücrenin nötrofiller olduğu gösterilmiştir. (Centola et al., 2000; Chae et al., 2006; Chou et al., 1998; Richards et al., 2001).



Şekil 2.9. İnflamazom aktivasyonu (Sutterwala et al., 2007).

2003 yılında Chae ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, Pyrin'in in vivo fizyolojik rolünün çalışılması amacıyla FMF'in bir fare modeli oluşturulmuştur. Homozigot pyrin mutant fareler, bakteriyal lipopolisakkarite (LPS) cevap olarak artmış IL-1 üretimi göstermişlerdir. Pyrin mutantlarda artmış kaspaz 1 aktivitesi, apoptoza artmış sensitivite ile ilişkilendirilmiştir. Pyrin mutant farelerde makrofaj apoptozunda gözlenen defektin sebebi, IL-1B ve kaspaz 1'den bağımsız ve muhtemelen ASC veya ASC'nin NF-kappaB aktivasyonundaki modüle edici rolünden kaynaklanmaktadır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre pyrin proteininin ASC ile indüklenen IL-1β işlenmesini engelleyerek ve makrofaj apoptozuna izin vererek antiinflamatuar bir molekül olarak görev yaptığı düşünülmüştür (Peynircioğlu ve Yılmaz, 2006; Papin et al., 2007).

FMF'li Türk hastalarda yapılmış olan 2 çalışmada semptomsuz hastalarda periferik kan lökositleri normal apoptoz göstermiş iken, inflamatuar ataklar süresince nötrofil ve monositlerde artmış apoptoz ve yüksek serum solubl FAS konsantrasyonları gözlenmiştir (Ozen vd., 2001; Kiraz vd., 2003). Diğer bir

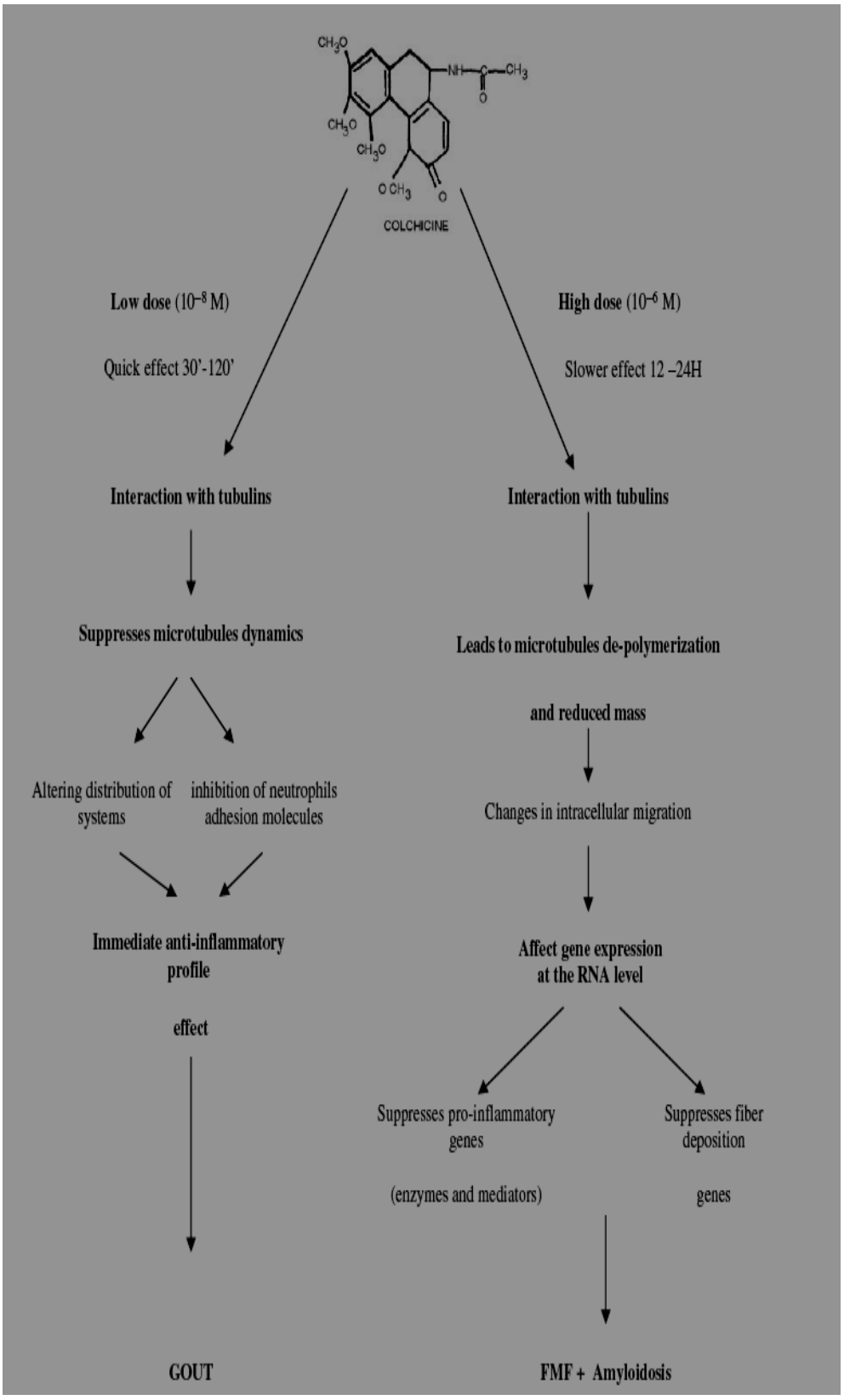
çalışmada, TRAPS'lı 7 hastada apoptoz defekti gözlenmemesi, TRAPS'ta lenfositlerin apoptotik potansiyelinin atak ile etkilenmediğini göstermiştir. HIDS'lı hastalarda apoptotik yolakların atağın sonlarına doğru aktive olduğu düşünülmüştür. Hücre spesifik defektlere odaklanılmasıyla FMF, nötrofiller ile karakterize edilirken, CINCA'da (kriyoprin ilişkili sendromlarda) mast hücreleri gösterilmiştir. Hücre tipi spesifitesi hipotezi, D'Osualdo ve arkadaşları tarafından 2006 yılında TRAPS'lı hastalarda gösterilen anormal nötrofil apoptozu ile desteklenmiştir. HIDS hastalarında lenfositlerde azalmış apoptoz gözlenmiş iken, bu lenfositik defekt TRAPS veya FMF'te gözlenmemiştir (Özen vd., 2001; Kiraz vd., 2003; D,Ousaldo et al., 2006; Bodar et al., 2007).

2.5. FMF Tedavisinde Kolşisin Ve Moleküler Mekanizma

FMF tedavisinde, kolşisin 1972 yılında ilk kez Goldfinger tarafından önerilip kullanılmaya başlanmıştır. Kolşisin çiğdem çiçeği bitkisinden elde edilen bir alkaloiddir (şekil 2.10). Kolşisin tedavisine yanıttaki bireysel farklılıkların genetik yatkınlık ve çevresel faktörlere bağlı olduğuna dair yapılmış çok çalışma bulunmaktadır. FMF tedavisinde hastaların %5-10'u kolşisin'e cevap vermemektedir. Kolşisinin tanımlanan etki mekanizması şekil 2.11'de gösterilmiştir.

Şekil 2..10. Kolşisinin elde edildiği çiğdem çiçeği; *Colchicium autumnale* (http://www.nzma.org.nz/journal/120-1248/2402/content01.jpg).

MDR1 geni 3435 C/T polimorfizminde mononükleer hücrelerde ekspresyonunun değiştiği ve MDR1 polimorfizminin kolşisin'e cevabı değiştirebileceği gözlenmiştir. Kolşisin rezistansı, MDR1 geni TT genotipinden ziyade C allelini taşıyan hastalarda daha yüksek gözlenmiştir (Tufan vd., 2007). İntraselüler reseptör proteinlerin hücre içi sinyal transdüksiyonunda oynadığı rollerin araştırılmasına dayalı çalışmaların son dönem artması ile özellikle kolşisin'e direnç geliştiren hastaların tedavisinde çok önemli fırsatlar sunacağını düşünmekteyiz.



Şekil 2.11. Kolşisin hareket mekanizmasına dair geliştirilmiş mekanizma (Ben-Chetrit et al., 2006).

Kolşisin tedavisi, FMF ataklarının şiddet ve sıklığı ile amiloidoz oluşumunu etki mekanizmaları bilinmemekle beraber önlemektedir. Kolşisine maruz bırakıldığında, supresyona veya indüksiyona uğradığı gözlenmiş gen grupları şekil 2.12'de verilmiştir. Kolşisin'in ASC'nin nokta benzeri agregatlar 'speck' oluşumunu engellediği ve hücre ölümünden sonra specklerin ekstraselüler bölgede varlığının devam ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada ASC'nin FMF hastaları renal glomerulusta ekspresyonu gösterilmiş iken sağlıklı kontrollerde gösterilememiş ve yüksek lokal ASC ekspresyonunun nokta benzeri agregatlar (speck) oluşumu ile sonuçlanabileceği ve ölen hücrelerden kalan nokta benzeri agregatların potansiyel amiloid nukleus olarak (belki pyrin ile ilişkili olarak) ekstraselüler bölgede yaşayabileceği önerilmiştir. Nokta benzeri agregatların oluşumunun tam bir mikrotübül sinyal ağı gerektirdiği gerçeği, potansiyel olarak profilaktik kolşisin tedavisinin FMF hastalarındaki amiloidozu önleme veya geriletme yeteneğini açıklayabilmektedir (Peynircioğlu vd., 2008).

Gene group	Gene name or symbol
Inflammation	*CASP1*
	GPR146
	NOS3
	G1P2
	IFIT1
	MX1
	IFITM1
	GBP1
	TNFSF10
	CTSC (cathepsin C)
	CTSZ (cathepsin Z)
	Plasminogen activator, urokinase
Cytoskeleton (tubulin, actin, adhesion molecules)	Tubulin 5 beta
	Tubulin beta 2
	CDC42BPA
	MYLIP
	Fibronectin
	Paracingulin
	PIK3C2B
	MAPK1
	RHOB
	RHOC
	RHOJ
	NSE2
	Cadherin-like 24
	Discoidin
	Nexilin
	Echinoderm
	Podocalyxin
	Moesin
	Coronin
	DUSP8
	Stanniocalcin 2
Transcription and growth factors	*TGFBR3*
	GATA3
	TIMP1
	PPP1CA
	Hoxa 5
	Actin-binding LIM
	STAT1
	APBB2
	AKAP12

Şekil 2.12. Kolşisine maruz bırakıldığında, supresyona veya indüksiyona uğradığı gözlenmiş gen grupları (Ben-Chetrit et al., 2006).

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Çalışma Grubu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ya da takip edilen FMF ön tanılı olgulardan; *MEFV* geni 2, 3, 5 ve10. ekson mutasyonları açısından 25 homozigot hasta; 15 M694V, 15 V726A ve 15 E148Q heterozigot hasta; 25 bileşik heterozigot hasta; 25 FMF P369S/R408Q-R202Q homozigot veya heterozigot (şüpheli grup) hasta; 20 polimorfizm taşıyıcı hasta 25 sağlıklı kontrol grubu çalışmamızda yer almıştır. Toplam 165 bireyden oluşan çalışma grubunun tamamı gen ekspresyon analizinde yer alırken; *MEFV* geni 2, 3, 5 ve10. ekson mutasyonları açısından 25 homozigot hasta; 15 M694V, 15 V726A ve 15 E148Q heterozigot hasta; 25 bileşik heterozigot hasta ve 25 sağlıklı kontrol grubundan oluşan 120 bireylik çalışma grubu DNA dizileme analizine tabi tutulmuştur.

Çalışma İzmir 1 nolu Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve çalışmada yer alan hastaların tümü genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamışlardır.

3.2. Araştırma Parametreleri

1. **Adım: Gen Mutasyon Analizi:** DNA dizi analizi ilk kez 1975 yılında İngiltere'de F. Sanger ve A.R. Coulson tarafından zincir sonlandırma (chain termination) metodunun geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu metod günümüzde artık tamamıyla otomatize edilmiştir. Otomatize DNA sekanslama yönteminin kullanılmasıyla MEFV ve ASC geni mutasyon analizleri, hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırmalı olarak NCBI GenBank ve protein database referans diziler ile karşılaştırılmış, mutant alleller, aminoasid mutasyonları veya nukleotit dizi değişimleri incelenmiştir.

2. **Adım: Gen Ekspresyon Analizi:** ASC geni mRNA ekspresyonu kantitasyonu, Revers Transkriptaz enzimi ile cDNA eldesi sonrası Real Time PCR tekniğinin kullanılmasıyla, hasta ve kontrol grubu arasında kontrol gen varlığında kantitatif olarak ortaya çıkarılmıştır.

3.3. Yöntem

1. Adım: Çalışma Grubunun Oluşturulması

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, Livneh ve arkadaşlarının önerdiği modifiye Tel-Hashomer kriterlerine uygun FMF ön tanılı hastalardan çalışmaya katılmayı kabul eden 165 kişi çalışma grubunu oluşturmuştur. Ayrıca, ailesinde FMF hikâyesi olmayan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 25 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmada yer almıştır.

Gönüllüler İçin Araştırmaya Dâhil Olma Kriterleri (İnklüzyon Kriterleri):

3.3.1. Major Kriterler

Tekrarlayan tipik Ataklarda (≥3 kez tekrarlayan aynı karakterde atak süresinin 12-72 saat ve ateşli olması, ateşin 38 °C ve üzerinde olması):

1. Genel peritonit
2. Tek taraflı pleurit veya perikardit.
3. Monoartrit (tek bir eklemin iltihaplanması: kalça, diz veya ayak bileği eklemlerinden biri).
4. Yalnızca yüksek ateş olması.
5. İnkomplet abdominal ataklar.

3.3.2. Minör Kriterler

1. Göğüs tutulumu ile karakterize inkomplet ataklar.
2. Karın tutulumu ile karakterize inkomplet ataklar.
3. Eklem tutulumu ile karakterize inkomplet ataklar.

4. Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı.
5. Kolşisin tedavisine olumlu yanıt.

3.3.3. Tanıyı Destekleyici Kriterler

1. Ailesinde AAA bulunması.
2. Etnik köken (Ailenin Akdeniz ırkından olması, hangi ülkede yaşarsa yaşasın).
3. Atakların 20 yaşından önce başlaması.
4. Atağın ciddi yatak istirahati gerektirmesi.
5. Atakların kendiliğinden geçmesi.
6. Ataklar arası semptom olmaması.
7. Geçici inflamasyonu gösteren anormal test cevabı (lökositoz, ESR, fibrinojen, CRP; SAA artışı).
8. Tekrarlayan proteinüri ya da hematüri.
9. Gereksiz laparotomi ya da apandektomi öyküsü.
10. Akraba evliliği.

'Genetik Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Form'unu okuyup kabul ederek imzalayan katılımcı, bu kriterler dâhilinde çalışmamızda yer almıştır. Çalışmaya alınması için 1 major kriter veya en az 2 minör kriter veya 1 minör+5 destekleyici kriter veya 1 minör+destekleyici kriterlerden ilk 5'inden 4 tanesinin bulunması aranmıştır.

3.3.4. Gönüllülerin Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri

Çalışmaya uyum sağlayamama, 2 yaşından küçük, 20 yaşından büyük olma, tıbbi kanıtlı başka hastalığının bulunması, hamile olması noktasında bireyler çalışmada yer almamıştır.

Hastaların detaylı anamnezi, öz ve soygeçmişleri alınarak başvuru şikâyetleri ve muayene bulguları, analiz sonuçları ile '**olgu rapor form**'unda yer almıştır.

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmanın başladığı 2009 Kasım ayı itibariyle ilk 6 ay süresince hastalardan kan örnekleri toplanmıştır. RNA Later içerikli 1,5 ml ependorf tüpler içinde FMF kesin, şüpheli ve olası tanıya sahip hastalardan 0,5 ml RNA later üzerine 0,5 ml kan alınarak toplam 1 ml içerikli tüpler -20 ^{o}C'de tutulmuştur.

Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden DNA eldesi için EDTA içeren tüpler içerisine 1cc kan örneği gen mutasyon analizi için, RNA eldesi için ise 0,5 cc kan örneği, RNA-Later solüsyonu içerisine konularak mRNA gen ekspresyon kantitasyonu analizi için alınmıştır. EDTA, DNA stabilizasyonu ile birlikte DNAaz'ların inhibisyonunu ve RNA Later solüsyonu da örneklerdeki RNA stabilizasyonunu sağlamıştır.

3.5. Periferik Kandan Genomik DNA Ekstraksiyonu

Periferal kan lökositlerinden total genomik DNA ekstraksiyonu, Genomic Prep Kit DNA izolasyon Kiti kullanılarak elde edilmiştir. Ekstraksiyon aşamaları hücre lizis solüsyonu ile hücre zarının uzaklaştırılıp hücre içeriklerinin açığa çıkması ve proteinaz K ile tüm hücresel ve nükleer histon proteinleri ile RNA'nın uzaklaştırılması ardından, alkolle DNA'nın membranda presipitasyon basamağı ile yıkama ile membrana bağlama basamakları sonucunda alkol, protein ve membran lipid kontaminasyonlarından uzaklaştırılmış halde en son uygulanan elüsyon basamağında DNA'nın saf olarak eldesi sağlanmıştır. Elüsyon tampon çözeltisi ile membrana bağlı kalan nükleik asidin %85-100'ü elüe edilir.

- **Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification (K1820-01)**

200 ul kan mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur.
Lysis: üzerine 20 ul proteinaz K ve 20 ul RNase A eklenmiştir.

Karıştırılır ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.

Üzerine 200 ul lysis-binding buffer eklendi. Vorteks ile homojen solüsyon elde edilinceye kadar karıştırılmıştır.

55 C'lik su banyosunda 10 dk protein digestion amaçlı inkübasyona bırakılmıştır.

Sonrata lizata 200 ul %100 etanol eklenir. 5 sn vortekslenmiştir.

Binding DNA: Lyzisli ve etanollü buffer kolona aktarılmıştır.

10000 g'de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

Kolon yeni toplama ependorfuna aktarılmıştır.

Washing DNA: 500 ul etanollü wash buffer 1 kolona aktarılmıştır.

Kolon, 10000 g'de (12000 rpm) 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

Kolon yeni ependorfa aktarılmıştır.

Kolona 500 ul etanollü wash buffer 2 eklenmiştir.

Kolon 14000 rpm (max hız) 3 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Ependorf atılıp, kolon tutulmuştur.

Eluting DNA: kolon steril 1,5 ml ependorfa aktarılmıştır.

Kolona 200 ul elüsyon buffer eklenmiştri. 1 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 1 dk max hızda santrifüj edilmiştir.

- ❖ Kolonu içeren tüp şu anda purifiye genomik DNA içermektedir.

Kolon 1,5 dk max hızda oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Tüp tamamen purifiye DNA içermektedir. Kolon uzaklaştırılmış, tüp; -20 C'de stok saklanmıştır.

3.6. DNA Miktarının Saptanması

DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop Spektrofotometre cihazında 260/280 nm dalga boyunda DNA solüsyonunun absorbans intensitesi ölçülmüştür.

3.7. DNA Kalitasyonu

2 uL (100 ng) DNA çözeltisi %1'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi için agarozdan 2 gr tartılarak 100 uL 1XTBE tapon çözeltisinden manyetik boncuk ile karıştırılıp mikrodalga fırında eritilmesinin ardından homojen görünüme ulaşılmış ve 60 C'ye soğutulmuştur. Üzerine 10 ug/mL konsantrasyonunda etidyum bromide (Sigma Co., S. Louis, MA, USA)

solüsyonundan 10 uL ilave edilmiştir. Bu solüsyon DNA interkalasyonu yapmakta ve DNA'yı UV ışık altında görünür kılmaktadır. Agaroz solüsyonu, jel tepsisine dökülmüş, üzerine tarak yerleştirilmiş ve sertleşinceye kadar beklenmiştir. Tank üzerine 1XTBE solüsyonunun eklenmesinin ardından taraklar çıkarılmıştır. 4 uL PCR-DNA molekülü, 2 uL Loading Dye (2 Orange G+4 PCR ürünü) ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Elektroforez EC105 cihazında (EC, Apparatus Co, USA) güç kaynağı 100 Mv-80Ma koşullarına ayarlanarak 30-40 dakika süreyle uygulanmıştır. Jeldeki DNA, UV transiluminatöründe (Vilber Inc, Lourmat France) baz sayısı bilinen standart DNA markırı (Hae III Fermentas) (1,5 ul bromofenol blue, loading dye+1,5 ul ladder-100 bp) ile karşılıklı olarak yüklenip, Syngene InGeneous jel kamera sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Kontrolü tamamlanan DNA molekülleri, DNA sekans analizine başlamak üzere +4 C'de saklanmıştır.

3.8. *MEFV* Ve *ASC* Gen Mutasyon Analizi

3.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

MEFV geni 4 eksonu (2, 3, 5, 10) için her bir eksona spesifik oligonükleotid primerler ile ayrı ayrı 4 PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. *ASC* proteinini kodlayan *PYCARD* geninin 925 bç nukleotidli cDNA'sının (NM.013258) tümü ve intron–ekson bağlanma bölgelerinden 820 bç olmakla toplam 1745 bç dizisini okumak için her bir eksona spesifik oligonükleotid primerleri ile Invitrogen PCR Kiti kullanarak ayrı ayrı 3 PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. PCR Koşulları

1 ul (100 ng) genomik DNA, Enhancer Buffer (20 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mMMgCl2) 2.5 uL, d NTP mix karışımı 0.5 uL (0.2 mM), forward primer 1 uL (10 pmol/ul), reverse primer 1 ul (10 pmol/ul) (Invitrogen) , 1.0 U PlatiniumTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), deionize su ile 25 uL

total volüme tamamlanmıştır. MyGene Gradient Thermal Cycler cihazında gradient programında amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. PCR Ürünlerinin Purifikasyonu

Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde kontrol edilerek pozitif PCR fragmanları Exo-SAP enzim karışımı kullanarak purifiye edilmiştir (5:1 oranında). Saflaştırılmış PCR ürünleri yeniden agaroz jel elektroforezine tabi tutularak jelde görüntülenmiştir. Gerekli görüldüğü takdirde amplifikasyon ürünü Nanodrop Spektrofotometrede kantite edilmiştir.

3.8.4. DNA Dizi Analizi; DNA Sekanslama Metodu

Saflaştırılmış PCR ürünleri BigDye Terminator v3.1(Applied Biosystems U.S.A) kiti kullanılarak DNA dizileme öncesi nükleotidlerin floresan işaretlemesi için ikinci PCR analizine (Cycle-Sequencing PCR) alınmıştır. Cycle-Sequencing PCR işleminden sonra elde edilecek olan 2. tur PCR ürünlerinin, BigDyeXT kiti kullanılarak presipitasyonları yapılmıştır. Presipite edilerek yeniden saflaştırılmış PCR ürünleri ABI 3100 Genetic Analyser otomatik DNA sekans sistemine yüklenerek nukleotid dizileri okunmuştur. DNA dizileme sonucunda nükleotid değişimleri, National Institute of Health'in web sayfasındaki (www.ncbi.nih.gov) genbank ve protein database referans dizileri ile karşılaştırılmıştır.

MEFV ve *PYCARD* genleri için yayımlanan GenBank ve ProteinBank ***MEFV*** geni için **NM**_000243; **NP**_000234 ve ***PYCARD*** geni için **NM**_013258; **NP**_037390 referans dizileri ile karşılaştırmalı olarak elde edilen sekanslarda olası mutasyon ve tek nukletid polimorfizmleri ile uygun aminoasit değişimleri saptanmak üzere okunmuştur.

3.9. ASC Gen Ekspresyon Analizi

3.9.1. Periferik Kandan RNA Ekstraksiyonu

Periferal kan lökositlerinden (PBLs) total RNA ekstraksiyonu için Qiagen RNA Blood Mini Isolation Kit kullanılarak mRNA elde edilmiştir.

3.9.2. Qiagen Qıaamp RNA Blood Mini Kit İle Kandan Total Hücresel RNA Purifikasyonu (52304)

1 volüm kan + 5 volüm buffer EL karıştırılmıştır.

15 dk buzda inkübasyon (süreçte 2 defa karıştırma) yapılmıştır.

400 g 10 dk +4 C santrifüj yapılıp, süpernatant atılmıştır.

Hücre pelletine buffer EL eklenmiştir (step 1'de kullanılan kanın her bir volümü için 2 volüm buffer EL eklenir, ör: 1 volüm kana 2 ml buffer EL)

10 dk santrifüj yapılıp, süpernatant atılmıştır.

(Buffer ELT: hücreleri degrede eder, homojenizasyon basamağına ilerlemeden görünen hiçbir hücre kalmamalıdır; lökositler pelleti oluşturur, eritrositler pellete kırmızı rengini verir).

0,5 ml kana kadar 350 uL RLT; 0,5-1,5 ml kana kadar 600 uL RLT eklenmiştir.

Pipetle karışmış olan tüm lizat çekilerek kolona aktarılmıştır. Homojenizasyon için max hızda 2 dk santrifüj yapılıp; kolon atılarak, pipetle lizat çekilerek alınmıştır

Lizata 1 volüm (350 veya 600 uL) %70'lik etanol eklenip, pipetle karıştırılmıştır.

Yeni kolona aktarılmıştır.

15 sn 8000 g santrifüj yapılmıştır.

Kolon 2 ml tüpe transfer edilmiştir, 700 uL Buffer RW1 kolona eklenmiştir, 15 sn 8000 g santrifüj (yıkama) yapılmıştır.

Kolon 2 ml tüple yer değiştirilmiştir, 500 uL Buffer RPE kolona pipetlenmiştir, 15 sn 8000 g santrifüj yapılmıştır.

Kolon açılmıştır, 500 uL buffer RPE eklenmiştir, 3 dk max hızda santrifüj yapılmıştır.

Kolon yeni tüpe aktarılmıştır, eski tüp filtratla beraber atılmıştır, max hızda 1 dk santrifüj yapılmıştır.

Kolon 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır, 30-50 uL RNA az free water direkt membran üzerine pipetlenmiştir, 1 dk 1000 rpm santrifüj (elüsyon basamağı) yapılmıştır.

3.9.3. RNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA molekülünün konsantrasyonu NanoDrop Spektrofotometre cihazı ile 280 nm dalga boyunda (saflaştırılmış RNA'nın oranı) ölçülmüştür. İzolasyon ve kantite edilen RNA'dan hemen cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Uzun dönemli saklama -80 ve daha kısa dönem saklama -20 C'de gerçekleştirilmiştir.

3.9.4. Revers Transkripsiyon PCR İle RNA'dan cDNA Sentezi

3.9.4.1. cDNA Sentezi

Quantitect Reverse Transcription Kit, izole edilen RNA'dan cDNA sentezinde kullanılmıştır. Iki basamaklı cDNA sentezinin ilk basamağını 14 uL total volümde gDNA wipeout buffer 7x, kalıp RNA, RNAaz içermeyen su karışımı ile ikinci basamağını 20 uL total volümde reverse transcription master mix ve ilk cDNA reaksiyon karışımı oluşturmaktadır. Thermal Cycler 42 C 30 dk ve 95 C 3 dk, 1 siklus cDNA reaksiyonunun sıcaklık döngüsü programını oluşturmuştur.

3.9.4.2. cDNA Kalitasyonu

PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.9.4.3. ASC Geni mRNA Ekspresyonu Ve Kantitasyonu; Real-Time PCR Metodu

Real-Time PCR, FMF'li hasta grubu ve sağlıklı kontrol olarak ifade edilen gruplar arasındaki hedef genin (ASC) mRNA miktarındaki değişimi gözlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu için Qiagen firmasından temin edilen Quantitect Prob RT-PCR kiti kullanılmış ve reaksiyonlar ABI PRISM 7700 cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyasının verdiği floresans, Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre verdiği Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon, ABI PRISM 7700 cihazının bilgisayarından on-line olarak izlenmiştir. Kontrol gen olarak RNaseP kullanılmıştır. Aynı cDNA örneği için, iki farklı reaksiyon karışımı ekspresyon düzeyi incelenecek olan ASC geni primeri ve reaksiyonda kontrol amaçlı olarak kullanılan RNaseP geninin primerleri ile Real-Time PCR'da çoğaltılmasına ilişkin hazırlanmıştır. Karışım; 25 uL 2xQuantitect Probe RT-PCR Master Mix, iki ayrı gene spesifik 10 uM konsantrasyonda forward, revers primerler ve prob setleri, 12 uL RNAaz-DNAaz free su ve 10 ng cDNA olmak üzere total volüm 50 uL'ye tamamlanmıştır. Standart real time PCR programı uygulanmıştır.

3.9.4.4. Değerlendirme

Sonuçlar Comparative Ct yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri hem ASC hem de GAPDH için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Daha sonra, ASC ortalama değerinden RNaseP ortalama değeri çıkarılarak ayrı ayrı hasta ve kontrol gruplarının ΔCt değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra kontrol grubu ΔCt değeri, hasta grubu ΔCt değerinden çıkarılarak ΔΔCt değeri bulunmuştur. Bu değer, aşağıdaki formüle uygulanarak, hasta grubunun ASC gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu belirlenmiştir.

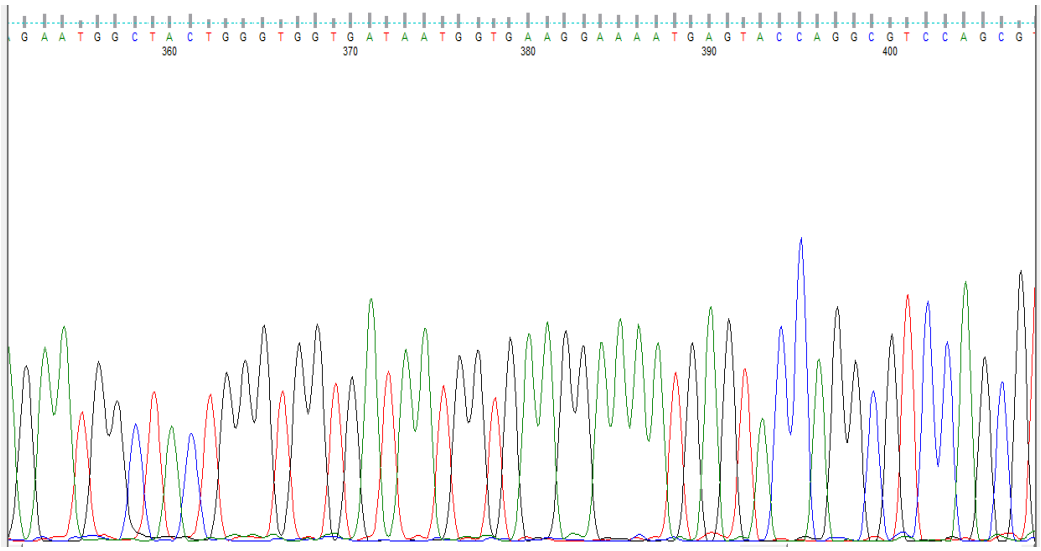
3.9.4.5. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, Kruskal-Wallis analizi ile SPSS 13.0 programında karşılaştırılmıştır. $p<0,005$ düzeyleri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

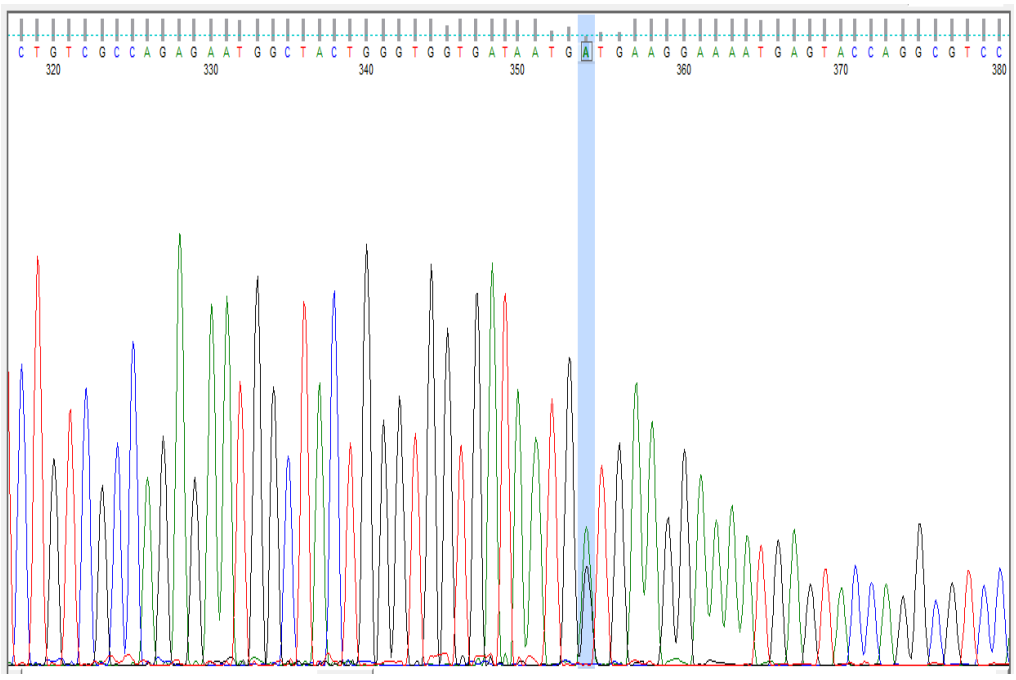
4. Bulgular

4.1. DNA Sekans Analizi Bulguları

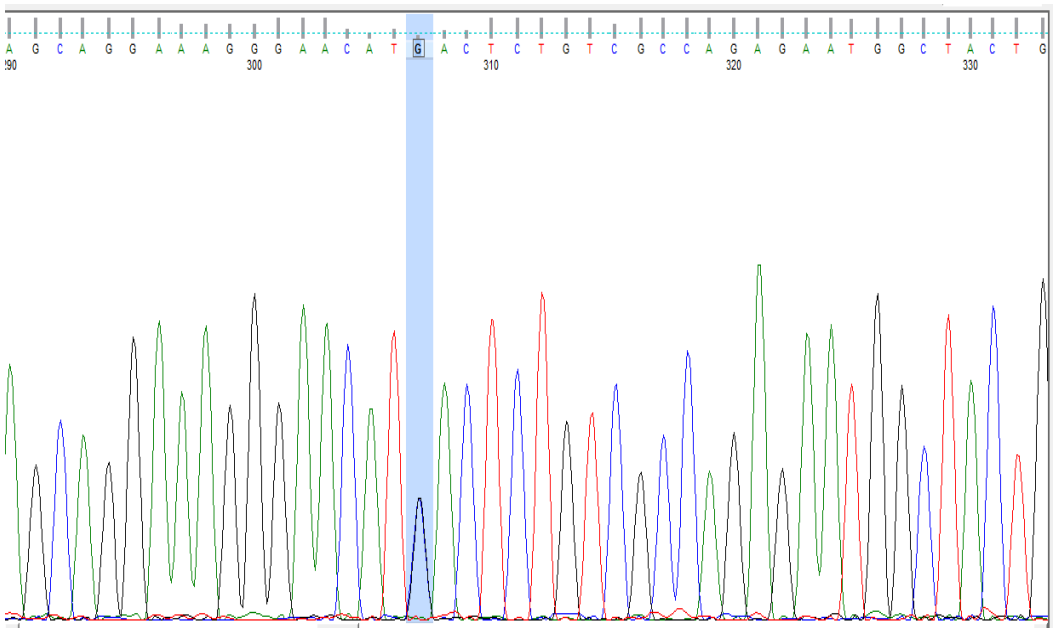
MEFV geni 2, 3, 5 ve 10. ekson mutasyonları açısından M694V homozigot mutasyonlu; M694V, V726A ve E148Q heterozigot mutasyonlu, P369S/R408Q-R202Q şüpheli bileşik heterozigot mutasyonlu, bileşik heterozigot mutasyonlu, polimorfizmli hastalar ve hiçbir mutasyon taşımayan bireylerin DNA sekans analizi elektroforegram sonuçları şekil 4.1 ile 4.18 arasında gösterilmiştir.



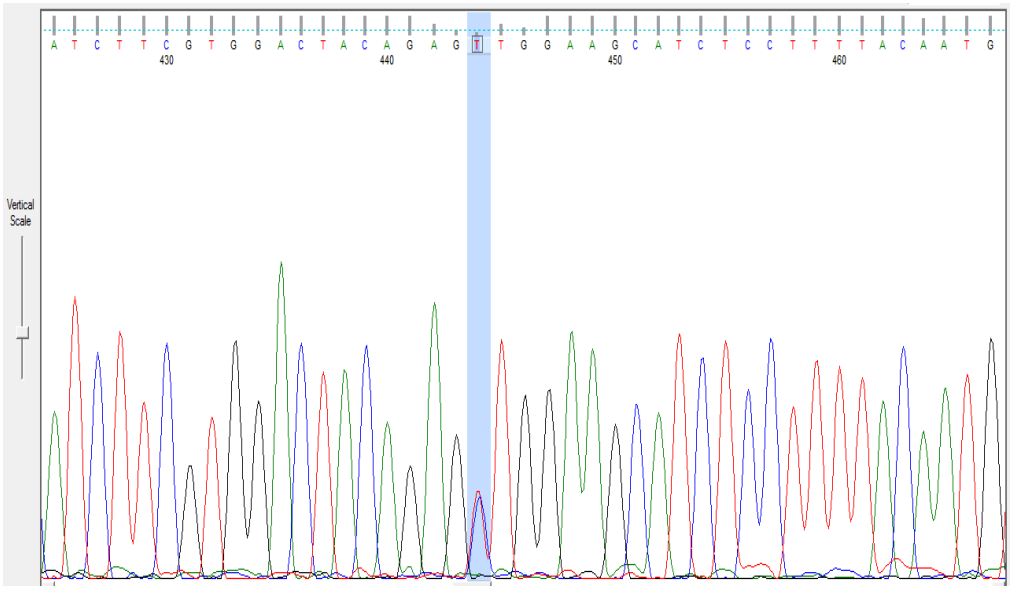
Şekil 4.1. p.M694V missense homozigot mutasyonu (ATG/GTG; c.2080A/G)



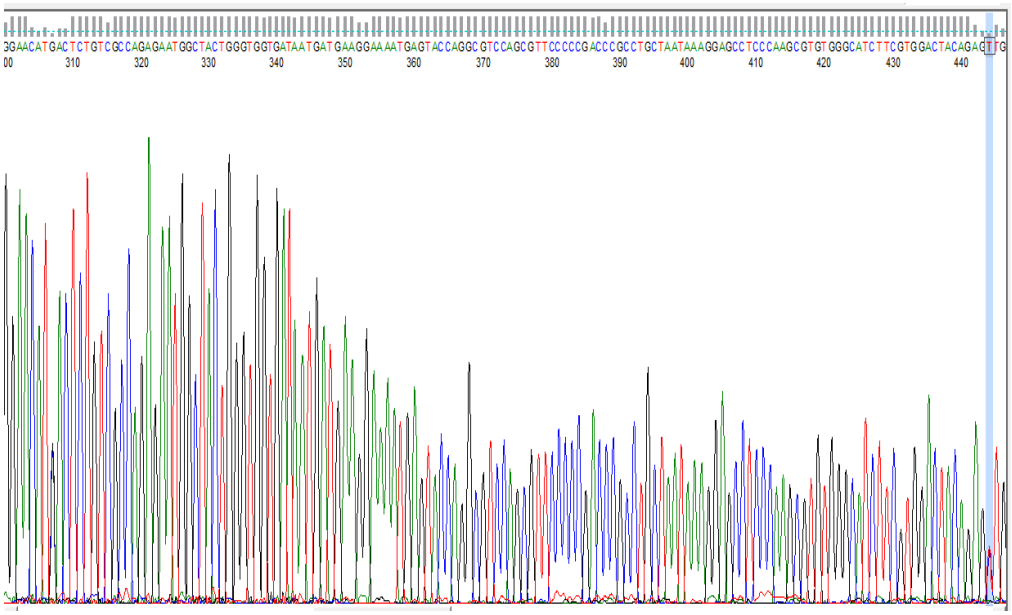
Şekil 4.2. p.M694V missense heterozigot mutasyonu(ATG/GTG; c.2080A/G)



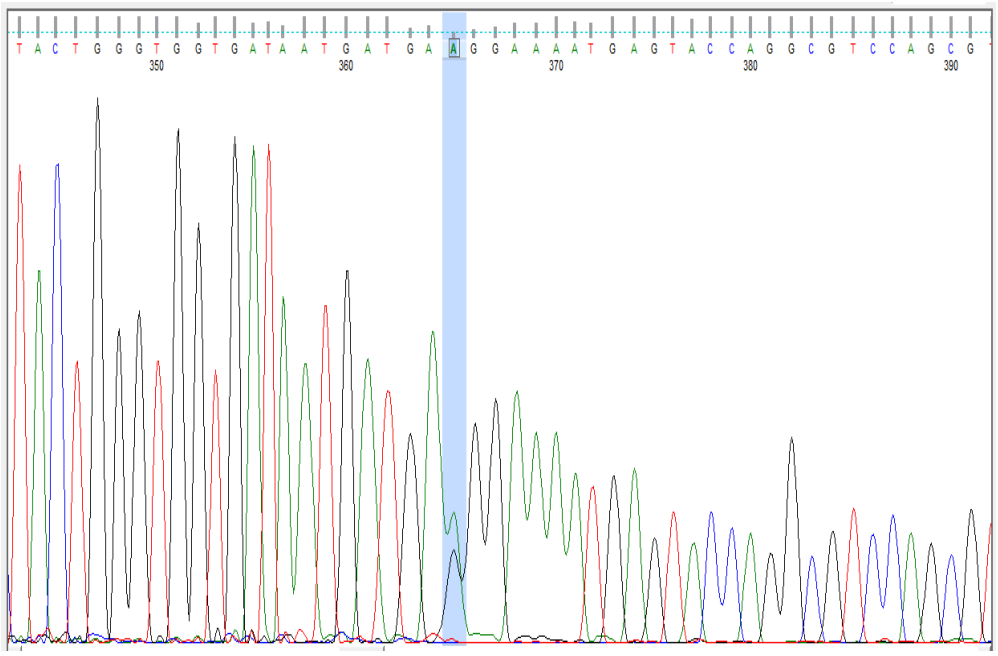
Şekil 4.3. p.M680IG-C missense heterozigot mutasyonu (ATG/ATC: c.2040G/C)



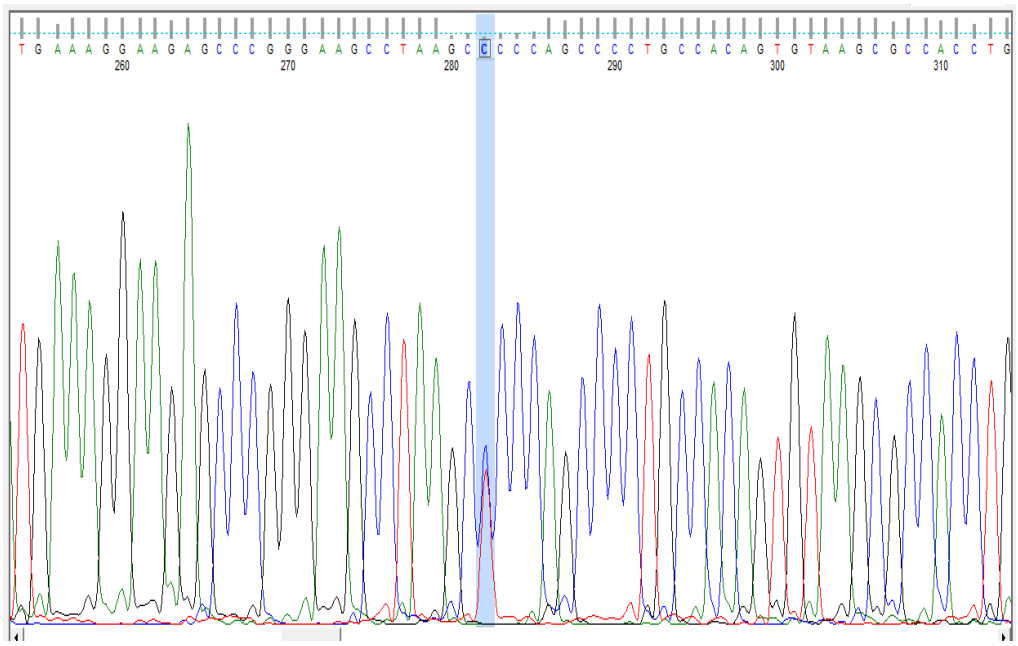
Şekil 4.4. p.V726A missense heterozigot mutasyonu (GTT/GCT: c.2177T/C)



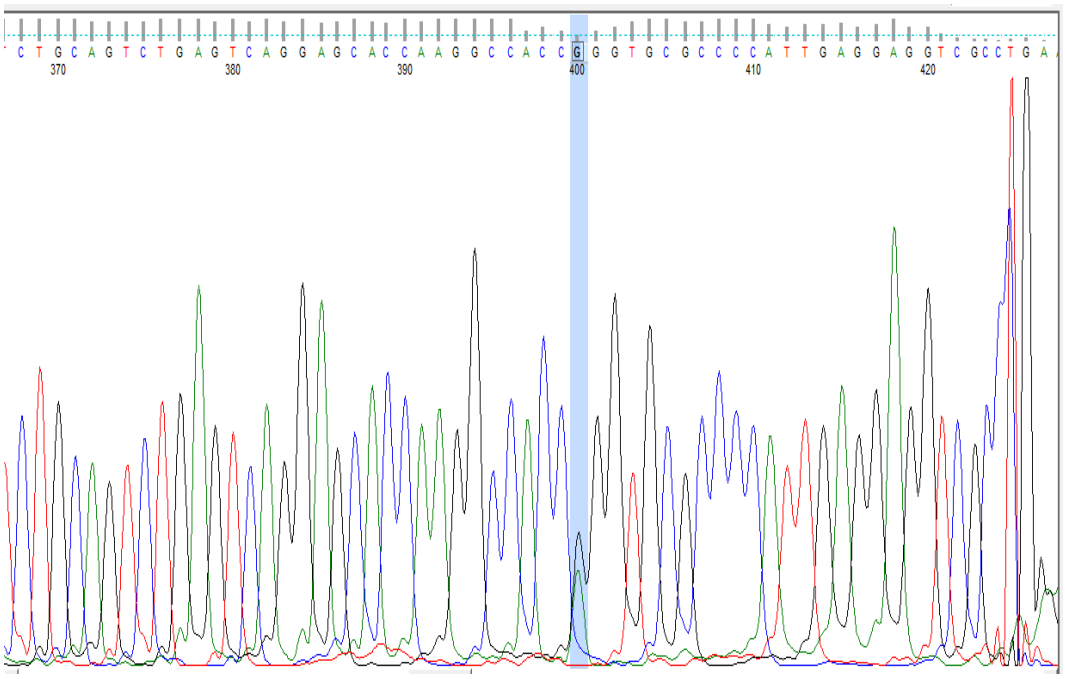
Şekil 4.5. p.M680I-V726A bileşik heterozigot mutasyonu sekans elektroforegramı



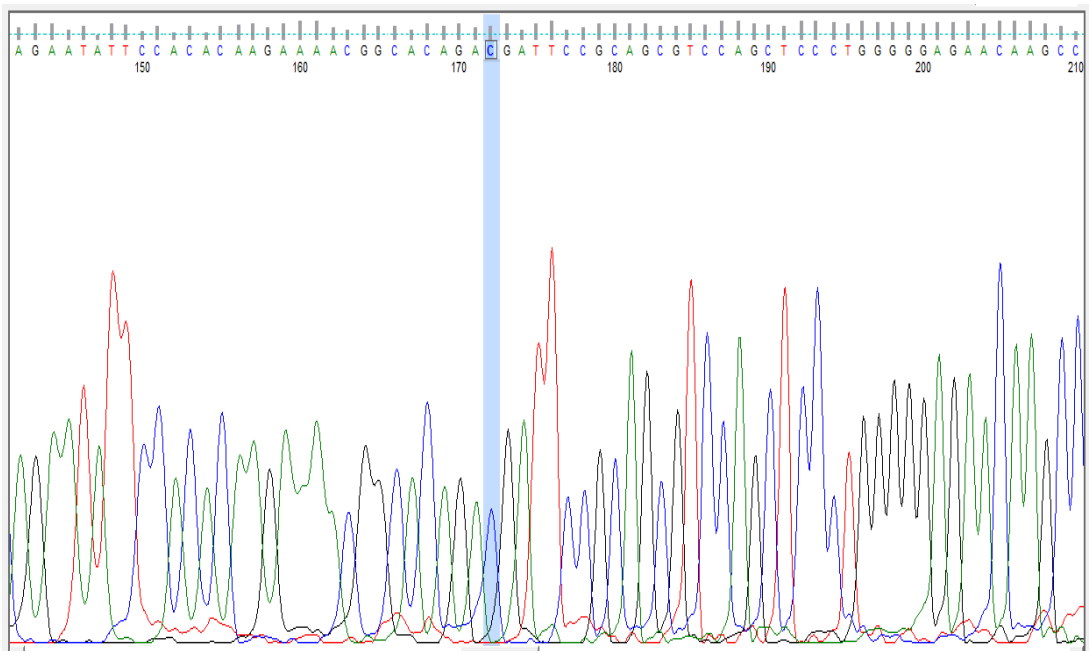
Şekil 4.6. p.K695R missense heterozigot mutasyonu (AAG/AGG: c.2084A/G)



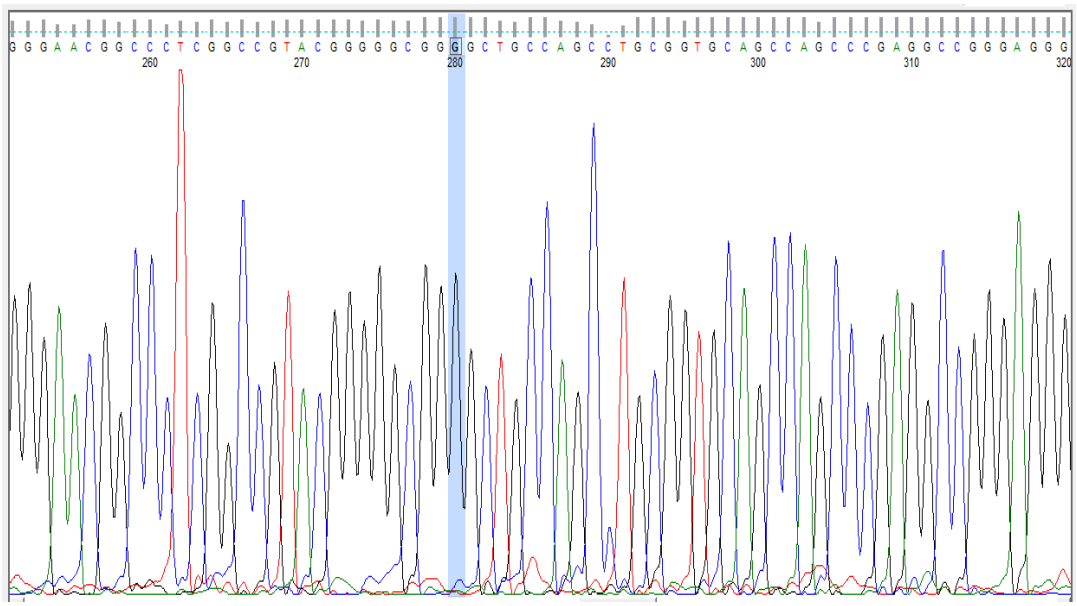
Şekil 4.7. p.P369S missense heterozigot mutasyonu (CCC/TCC/CCT: c.1105C/T).



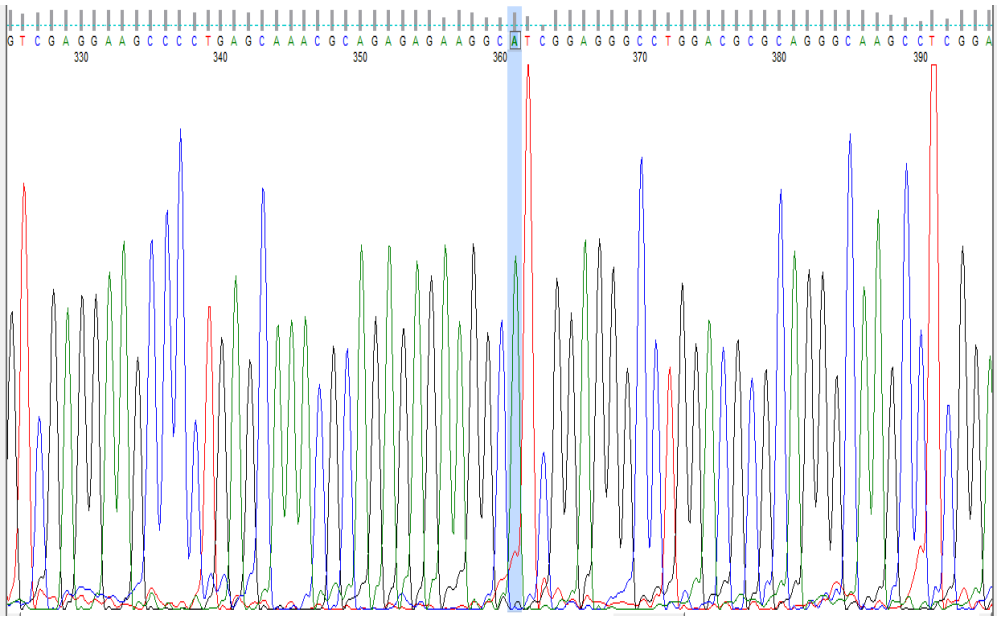
Şekil 4.8. p.R408Q missense heterozigot mutasyonu (CGG/CAG: c.1223G/A)



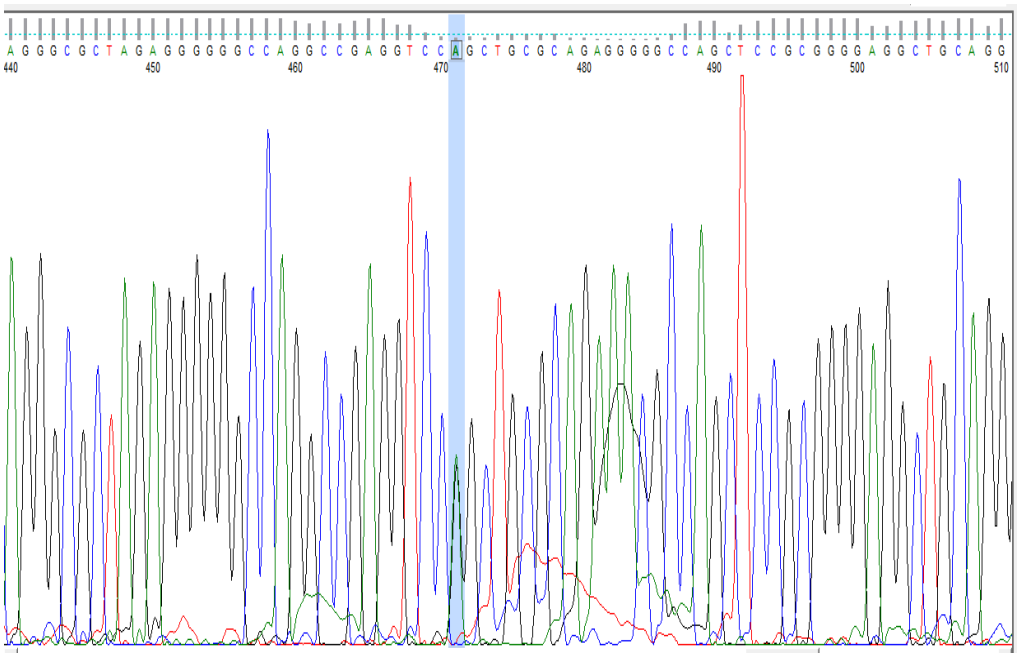
Şekil 4.9. p.D102D homozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GAT-GAC: c.306T/C)



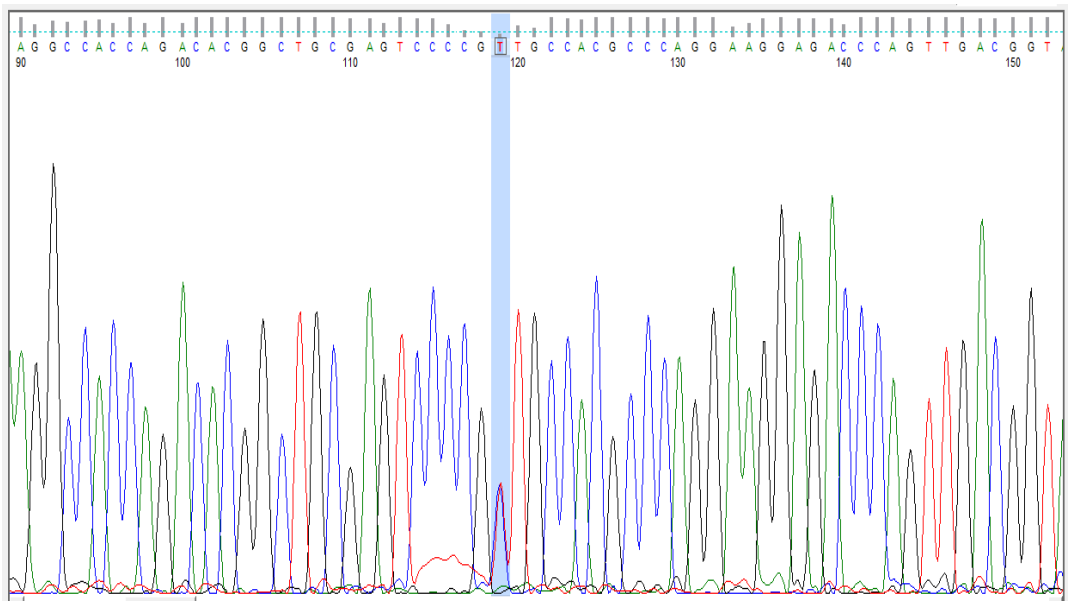
Şekil 4.10. p.G138G heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GGA-GGG:c.276A/G)



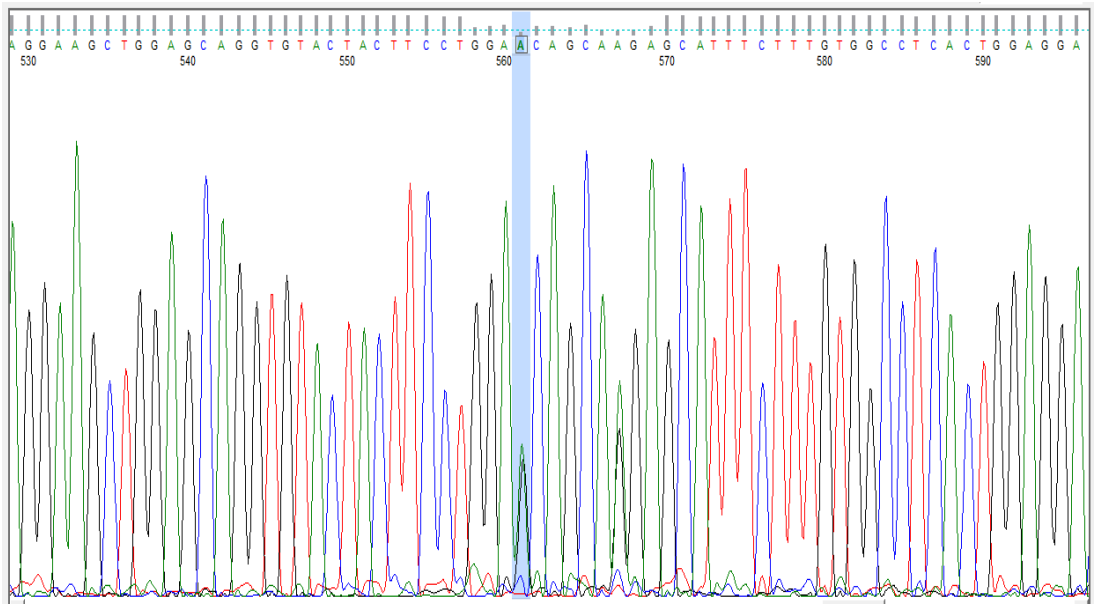
Şekil 4.11. p.A165A heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GCC-GCA: c.330C/A)



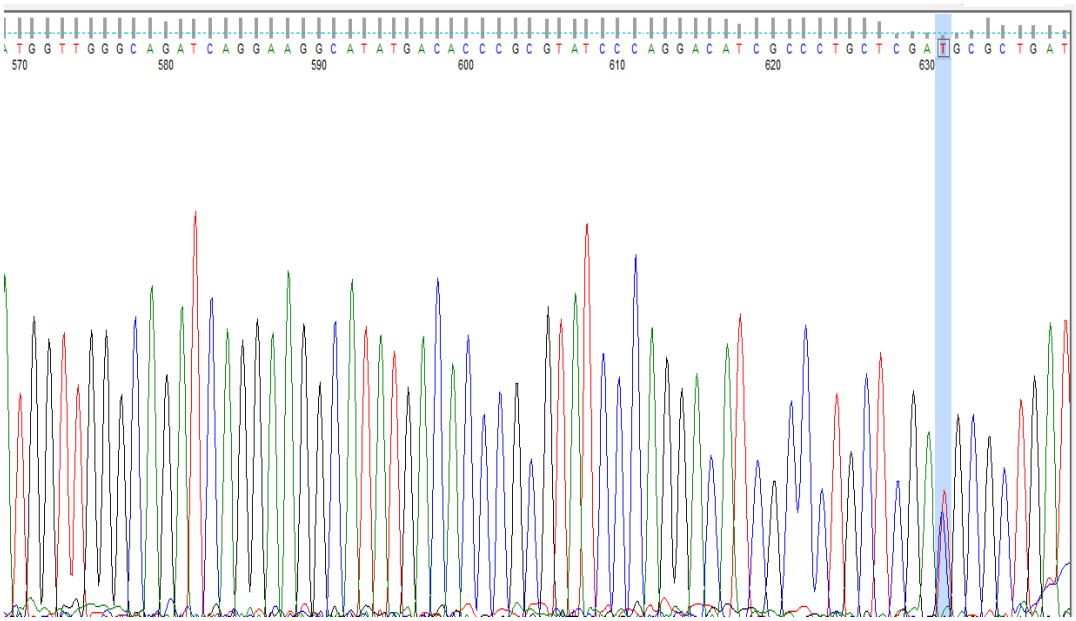
Şekil 4.12. p.R202Q heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (CGG-CAG: c.605G/A).



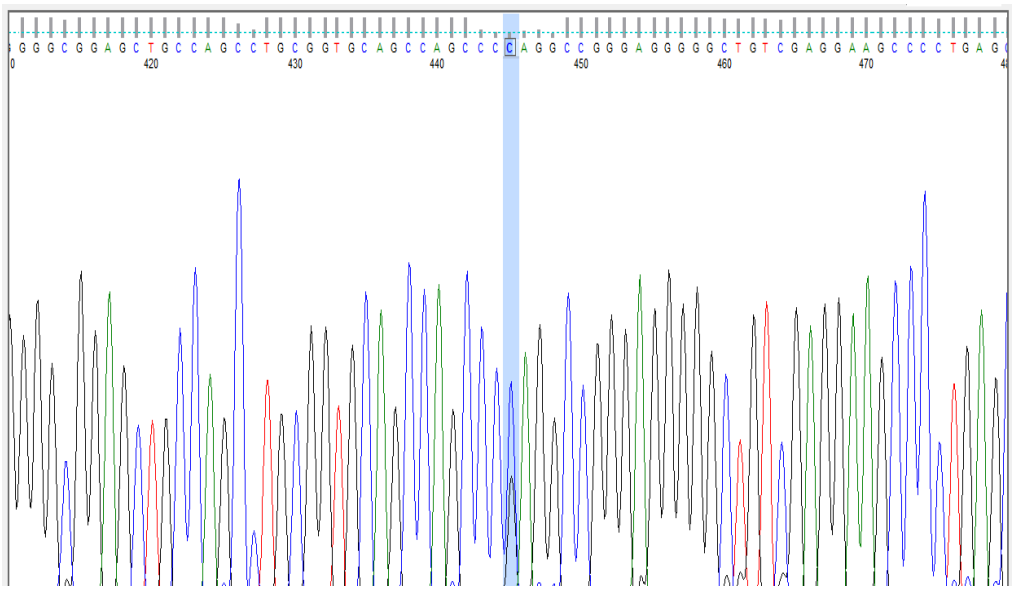
Şekil 4.13. p.R314R heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (CGC-CGT:c.942C/T).



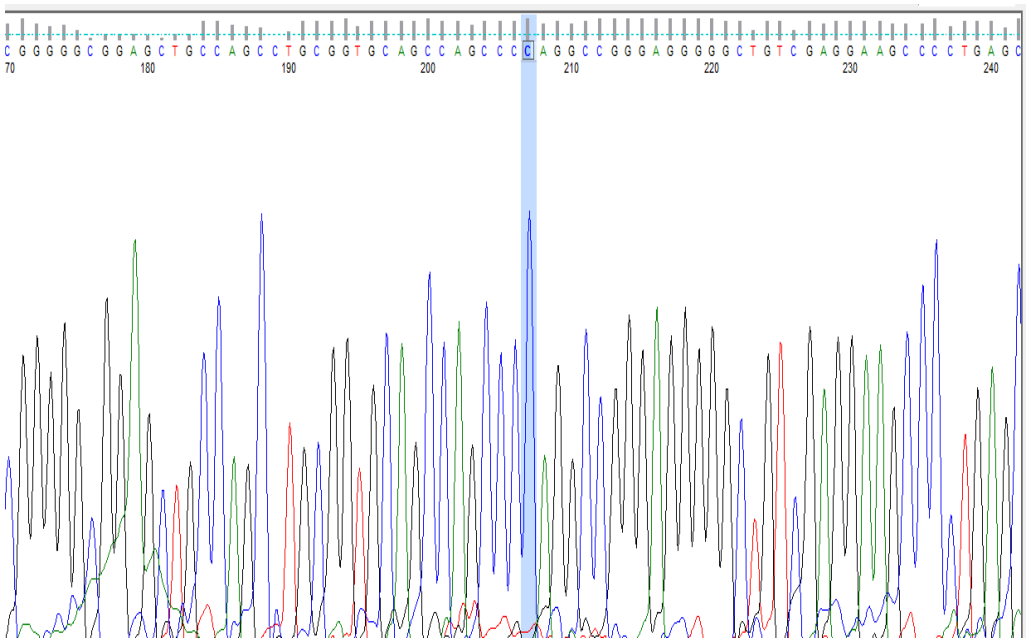
Şekil 4.14. p.E474E (GAA/GAG:c.1422A*G) ve p.Q476Q (CAG*CAA: c.1428G/A) heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm)



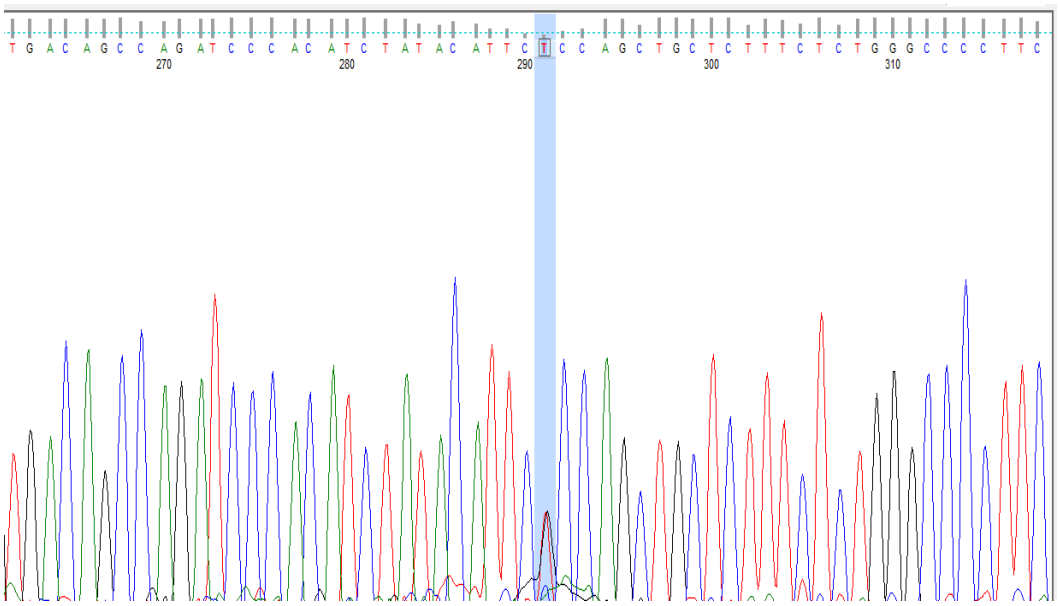
Şekil 4.15. p.D51OD heterozigot nükleotid değişimi (polimorfizm) (GAT*GAC: c.1530T/C).



Şekil 4.16. p.E148Q missense heterozigot mutasyonu (GAG-CAG: c.442G/C)

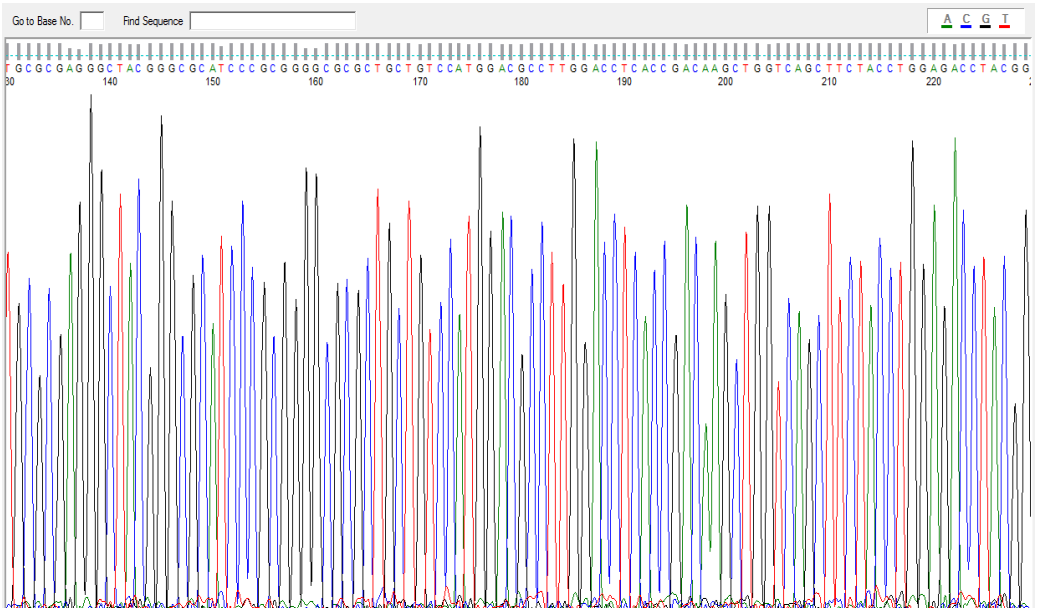


Şekil 4.17. p.E148Q missense homozigot mutasyonu (GAG-CAG: c.442G/C)

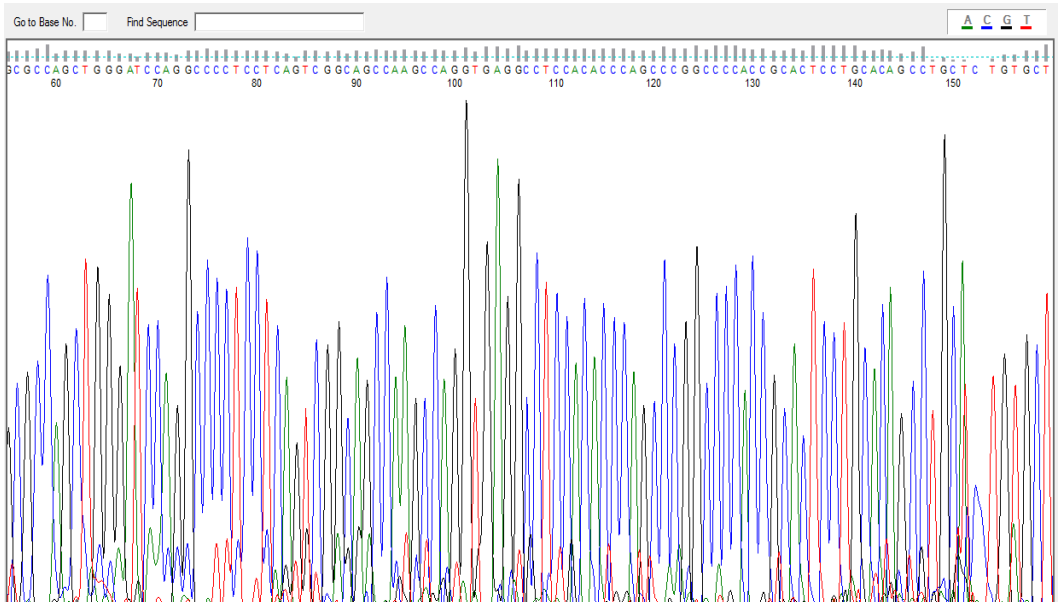


Şekil 4.18. p.A744S missense heterozigot mutasyonu (GCC-TCC:c.2230G/T).

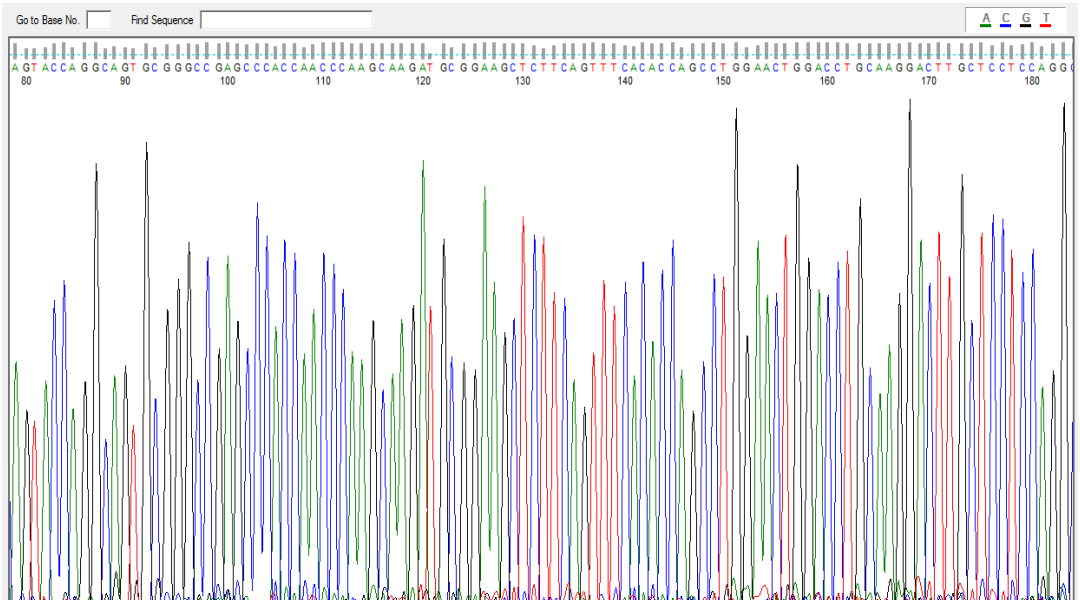
MEFV geni 2, 3, 5 ve 10. ekson mutasyonları açısından 25 homozigot hasta, 15- M694V, 15 -V726A ve 15 E148Q heterozigot hasta; 25 bileşik heterozigot hasta ve 25 sağlıklı kontrol grubunda gerçekleştirilen *ASC* geni tüm kodlayan eksonlarında yapılan mutasyon analizi sonucunda bu genin her bir kodlayan 3 eksonunda hiçbir mutasyon veya polimorfizm niteliğindeki sekans değişimine rastlanmamıştır. Şekil 4.19 ile 4.21 aralığında *ASC* geni her bir 3 eksonunun belirli bazı nükleotid bölgelerinin elektroforegram görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.19. ASC geni ekson 1 sekans elektroforegramı



Şekil 4.20. ASC geni ekson 2 sekans elektroforegramı

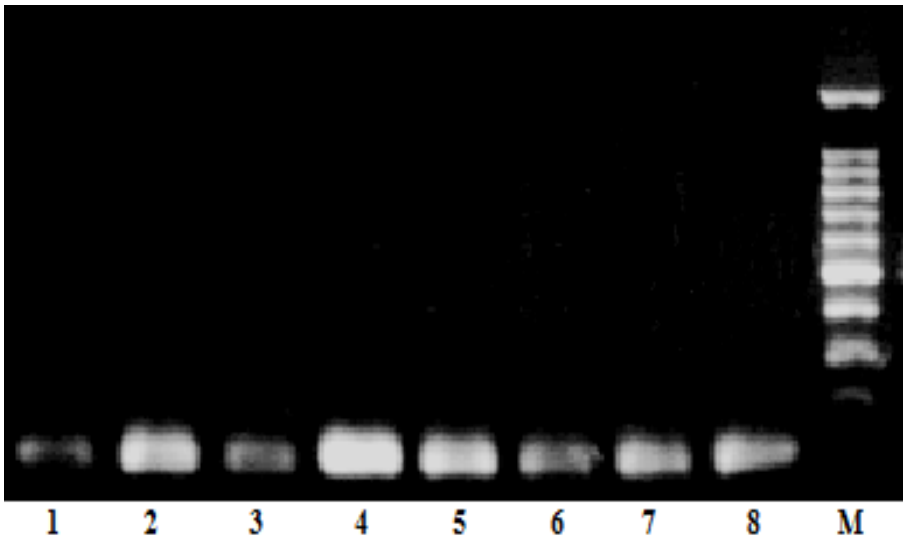


Şekil 4.21. ASC geni ekson 3 sekans elektroforegramı

4.2. Gen Ekspresyon Analizi Bulguları

4.2.1. PCR Ürünlerinin Doğrulanması

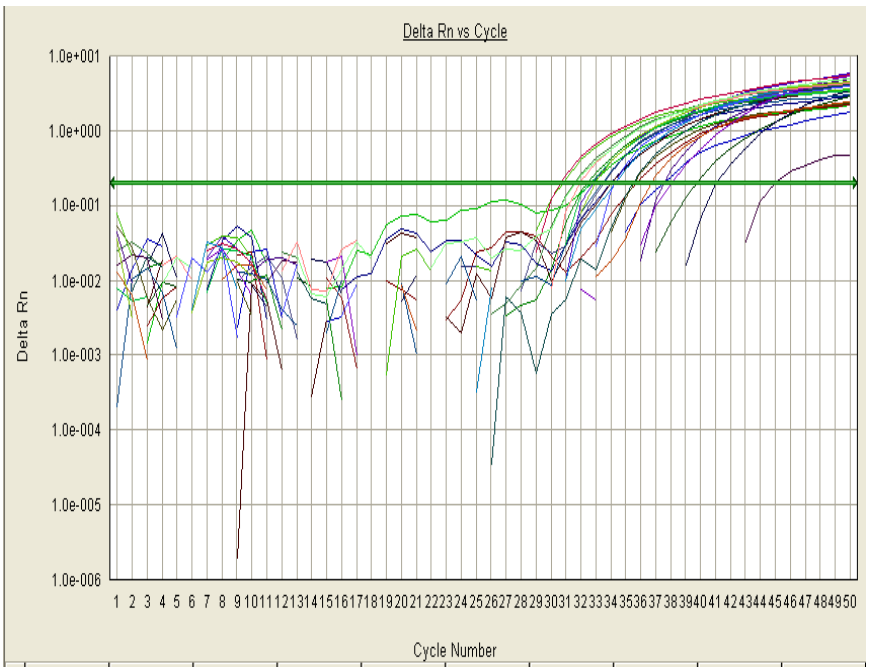
Revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya belirli ekson spesifik primerler kullanılarak dönüştürülen cDNA'nın hedef bölgelerinin çoğaldığını gösteren jel elektroforez görüntüsü şekil 4.22'de gösterilmiştir.



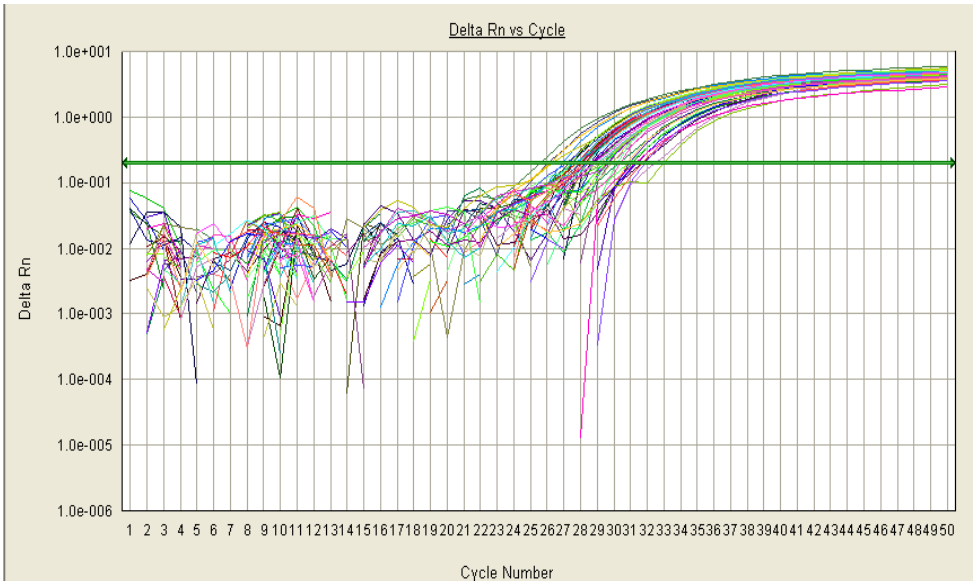
Şekil 4..22. cDNA ile gerçekleştirilen PCR analizi jel doğrulama elektroforez görüntüsü (1'den 8'e kadar olan kuyucuklara örnek olarak ilk 8 cDNA yüklenmiş ve prob olmadan sadece PYD primerleri ile konvansiyonel PCR yapılarak primer ve cDNA çalışma doğrulama analizi yapılmıştır; M: molecular weight marker).

4.2.2. mRNA Amplifikasyonu

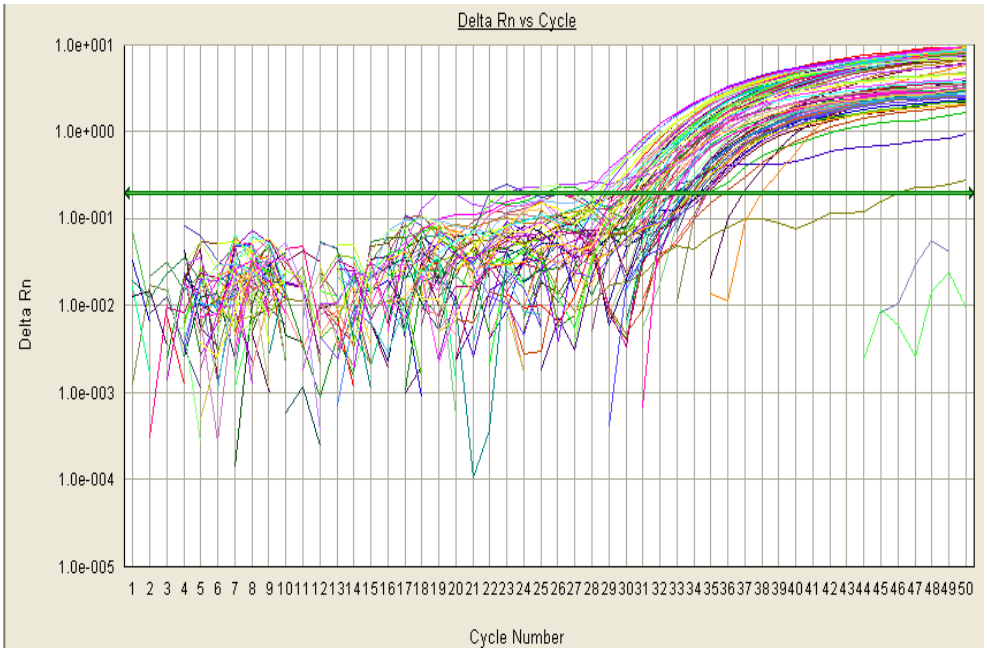
RT-PCR metodu ile gerçekleştirilen *ASC* geni amplifikasyonuna karşılık *RNaseP* internal kontrolünün amplifikasyon görüntüsü hasta alt gruplarında belirlenmiş ve örnek olarak aşağıdaki şekil 4.23, 24, 25 ve 26'da verilmiştir.



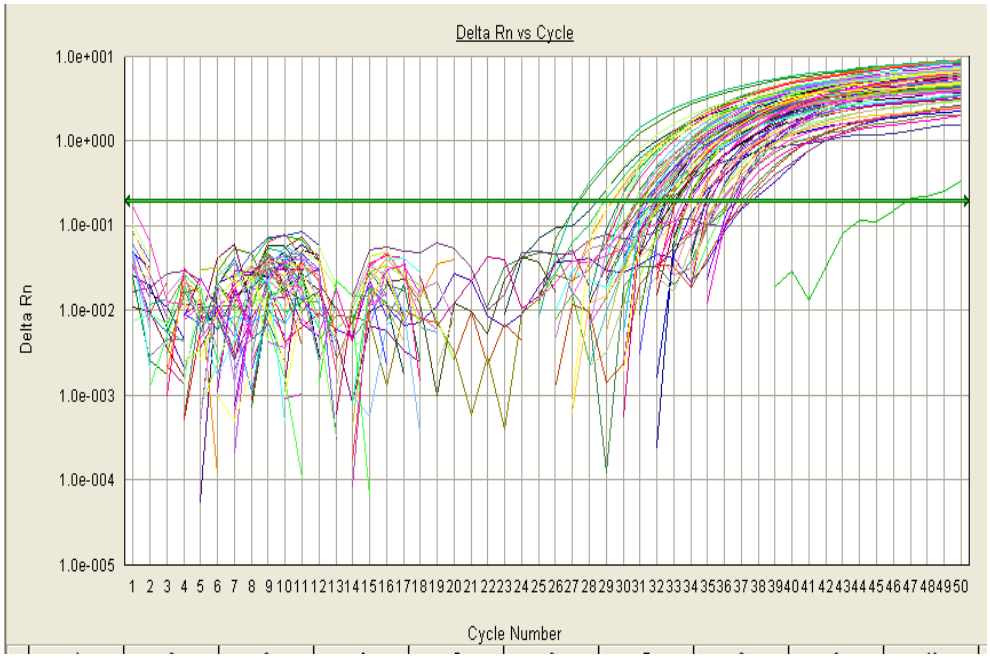
Şekil 4..23. *MEFV* geni bakımından homozigot saptanan grubun *ASC* geni mRNA amplifikasyonunun, *RNaseP* internal referans gene relatif mRNA amplifikasyonu.



Şekil 4.24. *MEFV* geni bakımından heterozigot saptanan grubun *ASC* geni mRNA amplifikasyonunun, *RNaseP* internal referans gene relatif mRNA amplifikasyonu.



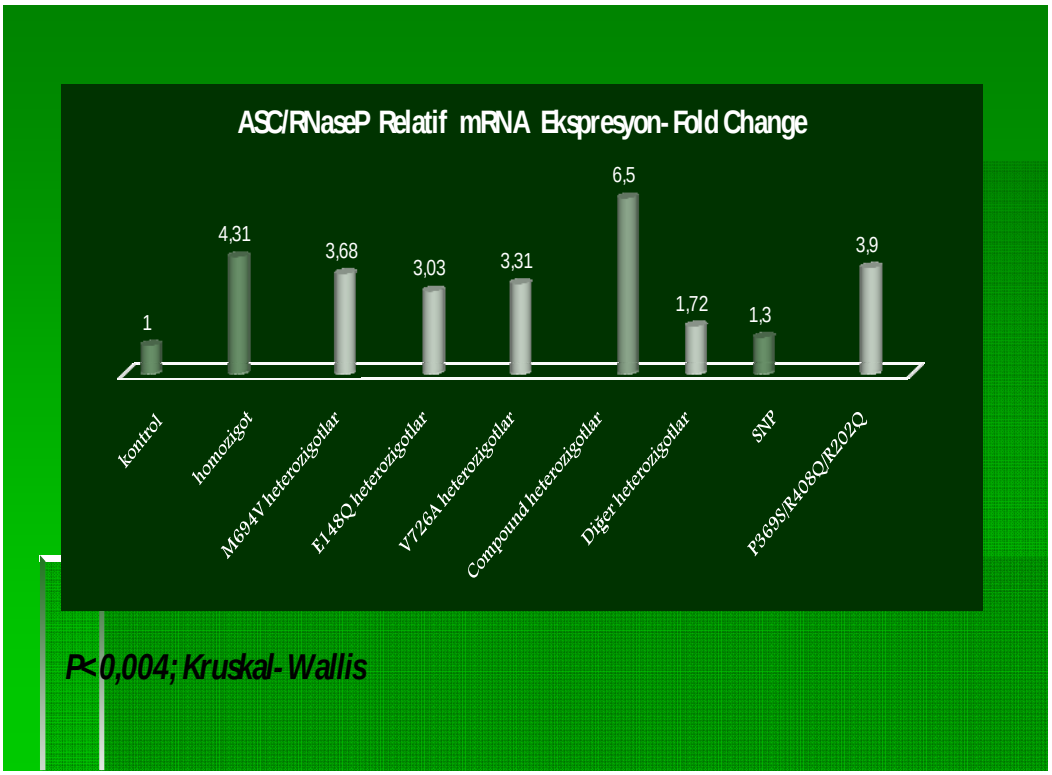
Şekil 4.25. *MEFV* geni bakımından bileşik heterozigot saptanan grubun *ASC* geni mRNA amplifikasyonunun, *RNaseP* internal referans gene relatif mRNA amplifikasyonu.



Şekil 4.26. *MEFV* geni bakımından sağlıklı saptanan grubun *ASC* geni mRNA amplifikasyonunun, *RNaseP* internal referans gene relatif mRNA amplifikasyonu.

mRNA düzeyleri internal kontrole göre normalize edilerek relatif (nispi, bağımlı, göreli, ilişkin: internal kontrole) ekspresyon düzeyleri bulunmuştur. Her bir hasta alt grubunda bulunan hastanın comperative threshold (Ct) değerleri elde edilmiş ve analiz metodu formülüne yerleştirilerek gen ekspresyonu artış veya azalışı anlamında (fold change) olarak hesaplanmıştır. Tüm hasta grupları öncelikle sağlıklı kontrol gruba göre ardından da hasta grupları kendi aralarında relatif mRNA düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre: sağlıklı kontrol gruba göre, *MEFV* M694V homozigotlarda 4,31 kat, E148Q heterozigot hasta grubunda ASC gen ekspresyonu 3,03 kat; MEFV V726A heterozigot hasta grubunda ASC gen ekspresyonu 3,31 kat; MEFV M694V heterozigot hasta grubunda ASC gen ekspresyonu 3,68 kat; MEFV bileşik heterozigot hasta grubunda ASC gen ekspresyonu 6,5 kat; MEFV P369S/R408Q-R202Q bileşik heterozigot şüpheli hasta grubunda ASC gen ekspresyonu 3,9 kat; MEFV polimorfizm grubunda ise ASC gen ekspresyonu 1,3 ve diğer heterozigotlar grubunda 1,72 kat artış göstermiştir (grafik 4.1). Sonuçlar istatistikî olarak anlamlı gözlenmiştir ($p<0,004$). Hasta alt gruplarının birbirleri ile arasında yapılan karşılaştırma analizinde ise; bileşik heterozigotlarda

homozigotlar ve heterozigotlara göre mRNA seviyelerinde artış gözlenmiş, ancak istatistikî anlamlılık saptanmamıştır (p>0,05).



Grafik 4.1. Hasta gruplarının sağlıklı gruba relatif olarak mRNA ekspresyonu kat değişimi

5. TARTIŞMA

Geçmiş on yıl boyunca herediter otoinflamatuar bozuklukların açıklanmasında önemli gelişmeler olmuştur. Bu bozukluklardan sorumlu tutulan genlerin tanımlanması ile klinik özelliklerin daha iyi karakterizasyonu, gelişmiş tanı ve yeni tedavi stratejilerinin gelişebilmesi anlamında büyük öneme sahip olmuştur. Herediter otoinflamatuar bozukların ilk tanımlanmış ve en yaygın görülmekte olan formu Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığı, ülkemizde 1:5 taşıyıcı oranlarında görülmekte ve bu hastalıkta sadece hasta olan bireylerin değil, aynı zamanda taşıyıcı bireylerin de klinik takip sürecinin önemini arz etmektedir. Bu sebeple, 2010-TIP-032 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi APAK proje çerçevesi kapsamında desteklenen çalışmamızın ilk aşamasını FMF oluşturmuştur. Bu çalışmanın temel amacını, nedensel hastalık geni olan *MEFV* geninde mutasyon varlığının yanı sıra modifikatör nitelikte ikinci bir allelin (*ASC* geni) etkisini DNA veya mRNA düzeyinde göstermek oluşturmuştur.

Genel periyodik ateş ve eklem ağrıları ile karakterize olan Ailesel Akdeniz ateşi hastalığında 1997 yılında klonlama çalışmaları ile sorumlu MEFV (Mediterranean Fever) geni 16 nolu kromozomda lokalize olarak tanımlanmış ve protein ürünü pyrin olarak gösterilmiştir. Bu hastalıkta non-fonksiyonel olarak gösterilen pyrin proteininin ilk yıllarda yapılmış olan çalışmalarda azaldığı ve bu proteinin eksikliğine dayalı olarak hastalığın geliştiği öne sürülmüştür. Ancak takip eden yıllarda ise bu proteinin eksikliğine dair kanıtlar gösterilememiştir. Canlı hücrede protein ekspresyonu, ‘gen ekspresyonu regülasyonu’ adı altında transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel, post-translasyonel ve epigenetik non-sekans düzenlenmelerine tabidir. Hücrede özellikle transkrispsiyonel düzeyde çalışılmış olan gen ekspresyonu regülasyonunda aktif rol alan transkripsiyon faktörleri ve bunlara ek represör ve aktivatör nitelikte proteinler yer almakta ve aktivasyon ile up-regülasyon, represyon ile down-regülasyon meydana gelmektedir. Hücrede inflamasyonu tetikleyen genlerin aktive olmasıyla hastalarda ateş süregelirken, bu sinyalizasyona represörler ile baskı yapılması, o genlerin ekspresyonunu durdurarak inflamasyonun sonlanması sağlanmaktadır. Bu proteinler DNA bölgesinin promoter veya enhancer dizilerine komplementer olarak gen ekspresyonu regülâsyonunu, aynen prokaryotlardaki

operon sistemleri gibi, canlı hücrenin ihtiyacına göre ayarlamaktadır. Ancak ökaryotlarda operon sistemleri yerine promoter ve enhancer sistemleri ile (transkripsiyon düzeyinde) bu işlemler yürütülmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin DNA dizisine bağlandığı bölgeye 'transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi' adı verilirken, DNA dizisinin bağlanılan bölgesine ise 'cevap elementi' adı verilmektedir. DNA dizisinde histon modifikasyonları ve kromatin düzenlenmeleri ile ortaya çıkan ve dizi değişimine neden olmadan transkripsiyon faktörünün bağlanma etkinliğini değiştiren değişimler ise özellikle 'metilasyon' ile gerçekleşen epigenetik regülâsyonlardır. Transkripsiyon faktörleri gibi yaşamsal genlerde baş gösteren mutasyonlar letaldir, çünkü bu genler genomda korunmuş genler olarak büyük bir bölümü kapsamaktadırlar. Dolayısıyla, hücre içinde önemli düzeyde etkileşim gösteren bu proteinler için sinyal transdüksiyonu esastır ve iletişimlerindeki bozukluklar hastalıkların ortaya çıkışı ile sonuçlanmaktadır.

MEFV geni 10 eksondan oluşur ve DNA değişiklikleri tipik olguların %80'den fazlasında son eksonda meydana gelir. Daha az görülen mutasyonlar ise ekson 2, 3, 5'tedir. AAA'lı hastaların etnik kökeni ne olursa olsun ekson 10'daki M694V, V726A, M680I, M694I mutasyonlarının en sık görülen mutasyonlar olduğu gösterilmiştir.

1997 yılında uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından birbirinden bağımsız olarak 16. kromozomun kısa kolunda klonlanmış olan MEFV geninde 4 nokta mutasyonu belirlenmiştir. Fransız AAA Konsorsiyumu kendi çalışma gruplarında taşıyıcı kromozomların %85'inde hastalıkla ilgili 4 mutasyonu göstermiştir (M694V, M680I, M694I, V726A).

1998'de bu mutasyonlara ek olarak ekson 10'da dört tane daha nadir görülen yeni mutasyon tanımlanmıştır. 692'de delesyon, Lys695Arg, Ala744Ser, Arg761His'tir. Bundan sonra ekson 2, 3, 5, 1 ve 9'da 36 mutasyon daha belirlenmiştir. Ekson 5'te Phe479Leu, ekson 2'de Glu148Gln, Glu167Asp, Thr267Ile bunlardan bazılarıdır. AAA'lı hastalar genellikle homozigot veya karma homozigot (2 alelde 2 farklı mutasyon taşıyan, compound heterozigot)

olarak görülmektedir. Takibinde nonsense mutasyonlar (Y688X, Y471X) ve nadir görülen sekans değişimleri ile polimorfizmler tanımlanmaya devam etmektedir. Özellikle 10. Ekson mutasyonlarından M694V hastalığın en ciddi komplikasyonu olan amiloidoz ile ilişkilendirmektedir. Bu bölge pyrin proteinin protein-protein interaksiyonundan sorumlu olan domain bölgesi B30.2 noktasına denk gelmektedir. Ancak, 10. Eksonda yer alan her mutasyon örneğin K695R ve V726 aynı fenotip ile karakterize değildir. Bununla birlikte, FMF Tip II olarak tanımlanan asemptomatik bireylerin varlığı da gelecek ağır komplikasyonlar için aynen sağlıklı taşıyıcı gruplar gibi risk taşımaktadır. Bu noktada, hastalığın, genin diğer eksonlarında görülen mutasyonlar ile de çok farklı klinik sonuçları doğurduğu gözlenmiş ve genotipik ve fenotipik bir heterojenitenin varlığı söz konusu edilmiştir. Bu noktada, diğer proteinlerin pyrin proteinin ile etkileşimleri ve bunların araştırılmaları büyük önem taşımaktadır.

İlk kez 1955 yılında tanımlanan ve Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığının en ciddi komplikasyonu olan amiloidoz, çeşitli organlarda fibriler proteinlerin depolanması ile karakterize bir protein metabolizması hastalığıdır. Sistemik amiloidoz etyolojisi multifaktöriyel olup primer ve sekonder (reaktif) tipleri tanımlanmıştır (Friman et al., 1996).

Amiloidoz, AAA'lı hastalarda sık görülen bir durum olup, AAA'nın amiloid A (AA) protein depolanmasından kaynaklanan en ciddi konmplikasyonudur. Bu AA tipi bir amiloidozdur ve son dönem böbrek yetmezliğine neden olan progresif nefropati olarak ortaya çıkar. Bunun dışında kalp, böbrek üstü bezleri, karaciğer, tiroid ve ince bağırsaklarda da amiloidoza rastlanabilir (Goldfinger, 1972). AA proteininin karaciğerde yapılan bir akut faz reaktanı olan serum amiloid A'nın (SAA) bir yıkım ürünü olduğu düşünülmüştür. SAA'nın uzun süre plazmada yüksek konsantrasyonda bulunması sonucu ürünü olan AA proteini dokularda birikebilir ancak SAA'nın artmış konsantrasyonu amiloidoz gelişimini açıklamak için yeterli değildir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar amiloidogenezin genetik alt yapısını açıklama konusunda SAA polimorfizmi üzerine odaklanmıştır. Bununla beraber TLR2 ve MDR genlerinde de polimorfizmlerin pyrin proteini üzerine etkilerinin varlığı yapılmış olan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Mutasyonlar bulunduktan sonra genotip-fenotip ilişkisi olup olmadığına dair pek çok araştırma yapılmıştır. Pras ve arkadaşları M694V mutasyonunu taşıyan hastaların diğer mutasyonları taşıyan hastalara göre bulguların daha erken yaşta ortaya çıkması, kolşisine yanıtın daha az olması, daha sık amiloidoz görülmesi açısından daha çok risk altında olduklarını ortaya koymuşlardır (Pras et al.,1994). Kastner ve arkadaşları 1998 yılında AAA'nın genetik tanısının duyarlılığını (sensitivite) saptamak için en sık görülen dört mutasyonu da kapsayan sekiz mutasyon açısından hastaları taramışlar, duyarlılığı %55 bulmuşlardır (Kastner et al., 1998). Mutasyonu olan ve olmayan hastalar arasında ataklarda görülen semptomlar açısından erizipel benzeri eritem dışında farklılık saptanmamıştır. Ancak atak sürelerine bakıldığında mutasyonu olan grupta en fazla üç gün, olmayan grupta ise 5-6 gündür ve bu fark anlamlı bulunmuştur.

Tüm bu verilen çalışmaların yanısıra bu sonuçları doğrulamayan çalışmalar da vardır. Shohat ve arkadaşları 1999 tarihli bir araştırmalarında Kuzey Afrika Yahudileri, Ermeniler ve Türklerden oluşan 83 AAA ailesinden toplam 138 AAA hastası üzerinde genotip-fenotip ilişkilerini incelemişler, farklı mutasyonları taşıyan gruplar arasında klinik özellikler açısından fark saptayamamışlardır. Amiloidozu olan ve olmayan hastalar arasında hastalığın ağırlığını belirleyen parametreler açısından fark bulunamamıştır. Türk ve Ermeni hastalarda plöritin Kuzey Afrika Yahudilerine göre daha sık olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmadaki amiloidoz hastalarının tamamının M694V mutasyonunu en azından bir alelde taşıdıkları görülmüştür (Shohat et al., 1999).

Çalışma sonuçları M694V mutasyonu üzerinde yoğunlaşmakla birlikte diğer mutasyonların klinik bulgular üzerine etkisini ortaya koyan yayınlar da vardır. Ben-Chetrit ve arkadaşlarının 1998 yılı çalışmalarında V726A mutasyonunun Askenazi Yahudileri, Dürziler ve Ermeniler'de sık görüldüğü, bu etnik gruplardaki amiloidoz sıklığındaki düşüklüğün V726A mutasyonunun amiloidozdan koruyucu etkisine bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Ben-Chetrit et al., 1998).

Ayrıca genotip-fenotip ilişkilerinin değerlendirildiği bazı çalışmalarda Ermeniler'de daha sık görülen M680I mutasyonunun hastalığın daha hafif formu

ve daha düşük amiloidoz sıklığı ile ilişkisi gösterilmiştir (Dewalle et al., 1998). Bir başka çalışmada Yalçınkaya ve arkadaşları 167 Türk AAA hastasını 12 klinik parametre ve sık görülen mutasyonlar açısından incelemişler, M694V homozigotluğu ile hastalık başlangıç yaşı arasındaki ilişki dışında diğer parametreler açısından fark saptamamışlardır. Aynı çalışmada M680I mutasyonunu çift alelde taşıyan, tek alelde taşıyan ve hiçbir alelde taşımayan 3 grup oluşturulmuş, homozigot grupta artrit sıklığının diğer 2 gruba göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüş, diğer parametreler açısından fark saptanmamıştır (Yalçınkaya vd.,2000).

Periyodik otoinflamatuar sendromlar için apoptoz yolaklarının bozukluğu genel bir özelliktir. Otoinflamatuar hastalıklarda gözlenebilen intraselüler inflamazom kompleksi proteinlerdeki olası mutasyonlar ve sonuçta oluşan apoptotik defekt, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna yol açarak inflamatuar polimorfonükleer lökosit hücrelerinin serozal dokulara göçüne sebep olabilir. 2003 yılında Chae ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, Pyrin'in in vivo fizyolojik rolünün çalışılması amacıyla FMF'in bir fare modeli oluşturulmuştur. Homozigot pyrin mutant fareler, bakteriyal lipopolisakkarite (LPS) cevap olarak artmış IL-1 üretimi göstermişlerdir. Pyrin mutantlarda artmış kaspaz 1 aktivitesi, apoptoza artmış sensitivite ile ilişkilendirilmiştir. Pyrin mutant farelerde makrofaj apoptozunda gözlenen defektin sebebi, IL-1B ve kaspaz 1'den bağımsız ve muhtemelen ASC veya ASC'nin NF-kappaB aktivasyonundaki modüle edici rolünden kaynaklanmaktadır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre pyrin proteininin ASC ile indüklenen IL-1β işlenmesini engelleyerek ve makrofaj apoptozuna izin vererek antiinflamatuar bir molekül olarak görev yaptığı düşünülmüştür (Peynircioğlu ve Yılmaz, 2006; Papin et al., 2007). Bu çalışmada düşünüldüğü üzere, ASC geni tam olarak pro-apoptotik adaptör protein fonksiyonunu gösteremediği için FMF hastalarında sağlıklı bireylere oranlara artmış inflamasyon ya da 'apoptoz defekti' gözlenmiş bulunmaktadır. Bu noktada, pro-apoptotik adaptör protein ASC geninin tek başına bir inflamasyon ya da apoptoz biomarkerı olduğu söylenemez. Çünkü hastalarda artmış olan oto-inflaasyonunun oluşumunda pyrin ya da ASC geninin tek başına çalıştığına dair kanıtlar henüz transfeksiyon çalışmaları ile sınırlıdır. Bu bulgular, pyrin

mutasyonları ile anlamlı düzeyde bağlantılı bulunmuş iken, protein ekspresyon analizlerini içeren çalışmaların yapılması gerekliliği uygun görülmektedir.

Pyrin proteini canlı organizmada periferal kan lökositleri ile serozal fibroblastlarda lokalize ekspresyona sahip iken, ASC proteininin çok daha geniş (neredeyse tüm dokularda) bir ekspresyon profili vardır. ASC ekspresyonu 2001 yılında Masumoto ve arkadaşları tarafından immünohistokimyasal analizler ile normal insan dokularında çalışılmış ve şu sonuçlar elde edilmiştir; spinal kord anterior boynuz hücrelerinde, plasenta villüslerinin trofoblastlarında, böbrek tübül epitelinde, testis seminifer tübülleri ve leydig hücrelerinde, karaciğer hepatositleri ve interlobuler safra kanallarında (bile duct), tonsiller ve derinin skuamöz epitelyal hücrelerinde, saç folikülünde, derinin yağ ve ekrin bezlerinde ve periferal kan lökositlerinde gözlemlenmiştir. Kolonda, kriptaların derinliklerinde lokalize olan immatür hücrelerden ziyade, luminal bölge tarafındaki olgun epitelyal hücrelerde gözlenmiştir. Sonuçta, *ASC* geninin yüksek seviyeleri, eksternal patojenlere karşı konakçı savunmasında yer alan epitelyal hücreler ve lökositler ile birlikte, regüle olan proliferasyona sahip iyi diferansiye olmuş hücrelerde fazlaca eksprese oluyor olarak bulunmuştur (Masumoto et al., 2001).

Bu konuda yapılmış olan çalışmalardan birinde, proinflamatuar medyatörlerden interferon, interlökin, tümör nekroz faktörü ve bakteriyal lipopolisakkaritlerin kullanıldığı ASC proteini gen ekspresyonu western-blotting çalışmalarında ilk 4 saatlik uygulamanın 2. saatinde artan gen ekspresyonunun son saate doğru azaldığı gözlenmiştir. Bu medyatörlerin tamamen kaldırıldığı koşullarda ise ASC protein ekspresyonunda hiçbir şekilde artış gözlenmemiş, bazal seviyede ekspresyonu devam etmiştir. Aynı grup, inflamasyonlu apandisit ve sağlıklı apandisit doku kesitlerinde gerçekleştirdikleri immünohistokimyasal analizlerde, bariz şekilde inflamasyonlu bölgelerde ASC speck oluşumlarını ve bunun Fas proteini varlığında indüklendiğini görmüşlerdir. Sonuçlar, otoinflamasyon konusunda ASC apoptozunun tam olarak hangi proteinler etkisinde olduğuna dair, görüldüğü kesin veriler vermemektedir. Yani, kaspazlar kadar, TNF, Fas ve diğer proteinlerin varlığı, bu yolakta sitoplazmik intraselüler regülatör proteinlerin etkileşimine dair birer birer sunulan kanıtlardan sadece bazılarıdır (Shiohara et al., 2002). Bizim çalışmamızdaki tetikleyici ise dış

uyaranlar değil, direkt olarak pyrin mutasyonlarının varlığıdır ve pyrin mutasyonlarının allelik yayılımı ile doğru orantılı olarak ASC geni mRNA ekspresyonu sağlıklı bireylere oranla artmış gözlenmiştir.

2002 yılında Notarnicola ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu MEFV gen ekspresyonu çalışmalarında, FMF'te hastalık fenotipinin oluşmasına katkıda bulunan *MEFV* geni mRNA ekspresyonu, mutasyonların sayısı ve tipine bağlı bulunmuştur. Mutasyonların allelik sayısıyla korelatif olarak, gen ekspresyonu azalmıştır. M694V mutasyonu, özellikle homozigot durumda, en düşük MEFV mRNA düzeyi ile E148Q mutasyonu ise en yüksek MEFV mRNA seviyesi ile ilişkilidir. Tek mutasyonlu FMF hastalarına kıyasla, her iki allelde de mutasyon taşıyan homozigot veya bileşik heterozigot hastalarda MEFV mRNA gen ekspresyonu azalmış bulunmuştur. Ayrıca, sağlıklı kontrollere relatif olarak FMF hastalarında istatistik anlamlı MEFV gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da MEFV geninin her iki allelinde de mutasyon taşıyan homozigot veya bileşik heterozigot hastalarda, heterozigot veya SNP'li gruba göre istatistik anlamlı düzeyde bir ASC geni mRNA ekspresyonu artışı görülmüştür. Sonuçların, kanıtlanmış modifikatör gen etkisinde, birbirleriyle ortak bir sinerjiye sahip otoinflamatuar yolak mekanizmasını kanıtladığı düşünülmektedir.

Notarnicola ve arkadaşları 2002 yılı çalışmaları ve takiben 2007 yılı Üstek ve arkadaşları tarafından *MEFV* geni pyrin ekspresyonu FMF'li hastalarda azalıyor olarak bildirilmiştir ve şimdiye kadar da öyle bilinmektedir. Ancak Booty ve grubu, bu hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla, istatistik olarak anlamlı olmayan ancak artan *MEFV* gen ekspresyonları (kat değişimleri) göstermiştir (Booty et al., 2009). Aynı grup, *MEFV* mRNA gen ekspresyonu kantitasyonu yanı sıra pyrin proteini western blot ekspresyon analizlerinde, sağlıklı kontrollere oranla FMF hastalarında yüksek pyrin seviyeleri gözlemlemişlerdir. Pyrin ekspresyonunun FMF hastalarına spesifik olup olmadığının anlaşılması için, FMF hastaları ve aktif inflamasyonlu FMF dışı hastaların pyrin seviyeleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta, FMF hastalarında yüksek ekspresyon gözlenmiştir. Ayrıca, 1 veya 2 *MEFV* mutasyonlu hastalar arasında, geçmiş çalışmalardan tamamen farklı olarak, istatistik anlamlı düzeyde fark gözlenmemiştir.

Yapılmış olan çalışmalarda, sadece bir alleli etkileyen *MEFV* mutasyonlarının AAA'ya neden olabileceğinin fark edilmesi, normal pyrin aktivitesinin %50'sinin hastalığı önlemeye yetemeyebileceğini düşündürmüştür.

Şimdiye kadar, dünya çapında *ASC* gen mutasyonları ilk olarak İtalyan populasyonunda araştırılmıştır. Caroli ve arkadaşlarının 2007 yılı İtalya merkezli çalışmaları *ASC* ile inflamazom kompleksi oluşturan CIAS1 geninin kodladığı cryopyrin proteini eksikliğinde oluşan bir herediter periyodik ateş sendromu olan 12 CINCA hastasında CIAS1 geni missens mutasyonlar tanımlanmış, *ASC* geninin İtalyan CINCA hastalarında mutasyona uğramadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte şimdilerde Booty ve arkadaşları tarafından 2009 yılı çalışmalarında pyrin proteinin hücre içi diğer proteinlerle ilişkisinin gösterilmesi amacıyla *ASC* gen mutasyonu DNA sekanslama analizi başlatılmıştır. Bu çalışmada 46 yahudi FMF hastası yer almış ve 1 hastada p.*W171X* (c.513G/A) nonsense mutasyonu gösterilmiştir. Bu mutasyon şu anda asosiasyon analizleri ile değerlendirme altına alınmıştır. Bu noktada, FMF'in etnik tercihinin *MEFV* mutasyonları yanı sıra *ASC* gen mutasyonları ile ilişkili olmadığı söylenebilir. Çünkü İtalyan merkezli çalışma ile bizim çalışma grubumuzda *ASC* geninde mutasyon veya polimorfizm niteliğinde herhangi bir sekans değişimine rastlanmamıştır.

FMF'li hastaların renal dokularında yüksek ASC mRNA ekspresyonlarını gösteren diğer bir çalışmada, kolşisin'in ASC'nin 'speck' oluşumunu engellediği ve hücre ölümünden sonra specklerin ekstraselüler bölgede varlığının devam ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada ASC'nin FMF hastaları renal glomerulusta yüksek ekspresyonu gösterilmiş iken sağlıklı kontrollerde gösterilememiş ve yüksek lokal ASC ekspresyonunun speck oluşumu ile sonuçlanabileceği ve ölen hücrelerden kalan specklerin potansiyel amiloid nukleus olarak (belki pyrin ile ilişkili olarak) ekstraselüler bölgede yaşayabileceği önerilmiştir. Speck oluşumunun tam bir mikrotübül sinyal ağı gerektirdiği gerçeği, potansiyel olarak profilaktik kolşisin tedavisinin FMF hastalarındaki amiloidozu önleme veya geriletme yeteneğini açıklayabilmektedir (Peynircioğlu vd., 2008).

Hem MEFV (pyrin) hem de ASC genlerindeki mutasyonlar doğal olarak apoptoza girecek lökositlerin yaşama devam etmelerine sebep olarak sonunda uzamış inflamatuar cevaba yol açmaktadır. Bu bağlamda, yeni farklı inflamasyon biomarker'larının fonksiyonlarının ortaya konulması ileride yapılabilecek inflamazom aracılı hastalıkların tanı ve tedaviye cevaplarının takibinde yeni bir nano teknolojinin gelişimini başlatacaktır.

Herediter otoinflamatuar hastalıklar grubundaki major sendromlarda genetik defektler tanımlanmış olmasına rağmen, bu sendromların inflamatuar ataklara yol açma mekanizmaları büyük oranda belirlenememiştir. Bir atağı tetikleyen faktörler; enfeksiyon, travma, aşılama ve hem fiziksel hem psikolojik strestir. Göreceli olarak önemsiz, sıradan zedelenmelere (travma) verilen normal immünolojik cevap zamanında durdurulamazsa bunun yerine çok güçlü ve genelleşmiş bir inflamatuar atak başlar. Bu sonuca, inflamasyonun down regülâsyonunda inhibitör sinyallerin eksikliği veya böyle sinyallere cevaptaki bir yetersizliğin sebep olduğu öngörülmektedir. Apoptoz, aktive lenfositlerin yaşam sikluslarını azaltarak inflamatuar cevabın down regülâsyonunda önemli bir rol oynar (Drenth et al., 2001; Touitou et al., 2004). Bu durumda, apoptoz regülâsyonundaki bir defekt, FMF hastalarında abartılmış inflamatuar cevabın bir sebebi olarak yer almaktadır.

Özellikle homozigot ve heterozigot pyrin defektif olgu gruplarının tedavisinde bir pyrin analoğu olan kolşisin standart tedavi olmasına rağmen tedaviye cevap vermeyen ya da tedavinin yan etkilerini tolere edemeyen kolşisin rezistant FMF hastalarında, pyrin'in dahil olduğu inflamazom kompleksi komponentlerinin diğer üyelerine odaklanmak, subklinik inflamasyon ve FMF komplikasyonlarında, hastalığın oluşumuna yol açmayan, düşük penetranslı ek modifikatör genlerin etkisinin gösterilmesiyle net bir fayda sağlayacaktır.

Sağlık Bakanlığı verilerine göre, dünya çapında bulunan 150 000 FMF hastasının 60 000 kadarının Türkiye'de olduğu düşünüldüğünde, şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda ASC gen mutasyonlarının belirlenmemiş ve bu konuda etnik kökenin etkisinin gösterilmemiş olması dolayısıyla, bu proje ile bizim bulgularımızın, ASC ve Pyrin etkileşiminin FMF patogenezi ve tedavisi ile

herediter otoinflamatuar hastalıkların genel inflamasyon döngüsünde önemli klinik göstergeler olarak yer alacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, kanıtlanmış bir *MEFV* mutasyonu olan FMF hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerde, hastalık ile ilişkili ikinci bir mutasyonun varlığı araştırılmıştır. FMF hastalığında fenotip ile genotip arasındaki ilişki farklı etnik gruplarda farklılık göstermekte ve çok tartışmalı yorumlar içermektedir. Patogenezde; kompleks alleller, modifiye edici lokuslar, genetik heterojenite ve olası epigenetik faktörler dolayısıyla fenotip ile genotip arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır. MEFV dışındaki genler lokus heterojenitesi sunarak FMF'e benzer klinik görünümden sorumlu olabilirler. FMF'te gözlenen klinik heterojenite, kısmen de genetik heterojeniteye dayanmaktadır. Özellikle son çalışmalarda FMF'te sorumlu MEFV geni dışında SAA, MDR1 (Touitou, 2001) ve TLR (Ozen vd., 2007) genlerinin sekans varyantlarının fenotip ile ilişkilendirilmesi, diğer otoinflamatuar genlerin de mutasyon taramalarının yapılabilirliğini düşündürmüştür. Bu konu, özellikle, asemptomatik ve MEFV geninde mutasyon saptanmayan bireylerde, monogenik olarak nitelendirilen otoinflamatuar hastalıkların digenik kalıtımın etkisinde olabileceğine dair birer örnektir. Özellikle 1 MEFV mutasyonlu FMF hastalarının, ikinci bir otoinflamatuar gendeki mutasyon (IL-1B yolağının regülasyonunda fonksiyon gören genler ile pyrin ile interaksiyona girdiği bilinen proteinleri kodlayan genler) ile sinerji içinde bu fenotipi doğurduğu düşünülmektedir.

Modifiye edici alleller, sistemik inflamasyon ve semptomatik FMF gelişimi için gerekli inflamasyon doz eşiğine katkıda bulunabilirler. Bu noktada, digenik kalıtım hipotezi altında ASC aday geni mutasyon taramasına tabi tutulmuştur. Bu çalışma, FMF ve takibindeki periyodik ateşlerde, poligenik kalıtımın araştırılmasına dair dünyada bilinen bir çalışma ile eş zamanlı olarak yürütülen tek çalışma olmuştur.

Şimdiye kadar Ailesel Akdeniz Ateşi ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda ASC gen mutasyonları ve ekspresyon seviyeleri belirlenmemiş ve disfonksiyonel pyrin olguları ile korelâsyonları saptanmamıştır. Türk FMF hastalarında ilk defa ASC gen mutasyonları araştırılmış ve hiçbir sekans değişimine rastlanmamıştır. ASC mRNA gen ekspresyon seviyelerinde ise sağlıklı kontrollere kıyasla, FMF

hastalarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış, MEFV gen mutasyonları ile korele edildiği için, hastalık patogenezindeki inflamasyon ile yakın ilişkili olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte, ASC mRNA ekspresyon düzeyleri ile MEFV gen mutasyonları arasında korelasyon gözlenmiş, ancak ASC gen mutasyonları ile bir ilişki gözlenmemiştir. Sonuç olarak, Türk hastalarda ASC geni mutasyona uğramayarak inflamazom kompleksinde evolüsyoner süreçte korunmuş tam bir domain yapısı sergilemiştir. ASC geninin tüm kodlayan eksonlarında yapılan DNA dizileme analizi sonucunda herhangi bir sekans değişimine rastlanmaması, FMF hastalık patogenezinde modifikatör bir rolü savunmamaktadır. Ancak, ASC geninin mRNA ekspresyon düzeyinde gözlenen göreceli artışı, FMF patogenezindeki farklı fenotiplerin karekterizasyonuna katkıda bulunuyor olabilir. İleriye dönük, genom asosiasyon ve protein ekspresyon çalışmalarının yapılmasının, sonuçlarımızı destekler nitelikte olabileceği düşünülmektedir.

Bu konuda çalışmamız, moleküler seviyede potansiyel hastalık mekanizmasına ışık tutacak ve dünya literatüründeki boşluğu dolduracaktır. Şu anki kolşisin tedavisine cevapsız olan FMF hastalarında, rekombinant IL-1 reseptör antagonistleri gibi ajanlarla yeni tedavi stratejileri geliştirmek ve geniş aralıktaki inflamatuar durumlarda ASC ve PYRIN gibi moleküllerin farmakolojik manipulasyonlarını uygulamak gelecek için temel hedefleri oluşturmaktadır. Yapılan çalışma ile oluşan bilgi birikimi, metod ve altyapı inflamatuar ve apoptotik yolakta mevcut diğer proteinlerin araştırılmasında da kullanılabilecek, inflamasyon ve doğal bağışıklığın temel mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olacak, klinik ve genetik olarak ilişkili diğer hastalıkların moleküler mekanizmalarıyla bağlantılar kurabilmemizi sağlayacak ve bilim adına araştırmacıların faydalanmasında kaynak olacaktır.

7. ÖNERİLER

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığında ikinci bir modifikatör allelin araştırıldığı bu çalışmada, bunu takiben yapılabilecek olan çalışmalar, genom asosiasyon analizleri ve linkaj bağlantı çalışmalarının düzenlenmesi olarak düşünülmekte ve önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Schaner P, Taskiran ZE, Richards N, Orhan D, Gucer S, Ozen S, Gumucio D and Yilmaz E., 2008, Expression of ASC in renal tissues of familial mediterranean fever patients with amyloidosis: postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition, Exp Biol Med (Maywood), 233(11), 33p.

Ben-Chetrit E., Lerer I., Malamud E., Domingo C. and Abeliovich D., 2000, The E148Q mutation in the MEFV gene: Is it a disease causing mutation or a sequence variant?, Hum. Mutat, 15, 1p.

Ben-Chetrit E., Bergmann S., Sood R., 2006, Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis, Rheumatology; 45, 8p.

Bodar EJ, van der Hilst JC, Van Heerde W, Van Der Meer JW, Drenth JP and Simon A., 2007, Defective apoptosis of peripheral-blood lymphocytes in hyper-IgD and periodic fever syndrome, Blood, 109(6), 8p.

Caroli F., Pontillo A., D'Osualdo A., Travan L., Ceccherini I., Crovella S., Alessio M., Stabile A., Gattorno M., Tommasini A., Martini A. and Lepore L., 2007, Clinical and genetic characterization of Italian patients affected by CINCA syndrome, Rheumatology, 46, 5p.

Centola M. and Wood G., 2000, The Gene For FMF, MEFV is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators, Blood, 95, 31p.

Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, and Kastner DL., 2003, Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis, Mol Cell., 11(3), 13p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ and Kastner DL., 2006, The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL1beta production, Proc Natl Acad Sci U S A., 103(26), 7p.

Chou JJ, Matsuo H, Duan H and Wagner G., 1998, Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment, 94(2), 80p.

Church LD, Cook GP and McDermott MF., 2008, Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders, Nat Clin Pract Rheumatol, 4(1), 8p.

Dewalle M., Domingo C. and Rozenbaum M., 1998, Genotype-Phenotype corelation in Jewish patients suffering from Familial Mediterrenean Fever, Eur. J.Hum.Genet, 6, 7p.

Doğanavşargil E., 2003, Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Kitabevi, İzmir, **57s.**

D'Osualdo A, Ferlito F, Prigione I, Obici L, Meini A, Zulian F, Pontillo A, Corona F, Barcellona R, Di Duca M, Santamaria G, Traverso F, Picco P, Baldi M, Plebani A, Ravazzolo R, Ceccherini I, Martini A and Gattorno M., 2006, Neutrophils from patients with TNFRSF1A mutations display resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis: pathogenetic and clinical implications, Arthritis Rheum, 54(3), 10p.

Drenth J.P. and Van Der Meer JW., 2001, Hereditary periodic fever, N. Engl. J. Med., 345, 9p.

Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, Podswiadek M, Punzi L, Sebastiani GD, Touitou I and Doria A., 2006, Autoinflammatory syndromes, Clin Exp Rheumatol., 24(40), 6p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Goldfinger S.E., 1972, Colchicine for Familial Mediterrenean Fever, Letter, New Eng. J. Med., 30p.

Grateau G., 2006, Autoinflammatory diseases, Acta Clin Belg, 61(5), 9p.

Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, Carlson A, Merriam S, Lora JM, Briskin M, DiStefano PS and Bertin J., 2002, Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1, FEBS Lett,; 530(1-3), 8p.

Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M and Cesena T., 2006, Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis, Clin Exp Rheumatol, 20 (26), 8p.

Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Matsumoto N, Masumoto J, Inohara N and Suda T., 2005, ASC-mediated NF-kappaB activation leading to interleukin-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP, J Biol Chem., 280(15), 30p.

Heller H., Sohar E. and Sherf L., 1958, FMF, Ach. Intern. Med, 102:21p.

Hoffman HM., 2007, Hereditary immunologic disorders caused by pyrin and cryopyrin, Curr Allergy Asthma Rep, 7(5), 30p.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, Erişim tarihi: 05 Mayıs 2010

Internet Fevers; http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers, Erişim tarihi: 05 Mayıs 2010.

Kasapçopur Ö. ve Arısoy N., 2006, Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer Otoinflamatuar Hastalıklar, Türk Pediatri Arşivi, 41, 8s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kiraz S, Ertenli I, Oztürk MA, Haznedaroglu IC, Calgüneri M, Atalar E, Ozbalkan Z, Kirazli S ve Celik I., 2003, Increased soluble FAS suggests delayed apoptosis in familial Mediterranean fever complicated with amyloidosis, J Rheumatol., 30(2), 5s.

Livneh A., Langevitz P. and Shinar Y., 1999, MEFV Mutation Analysis in patient suffering from amiloidosis of Familial Mediterrenean Fever, Amyloid, 6:6p.

McDermott MF., 2004, A common pathway in periodic fever syndromes, Trends Immunol, 25, 3p.

Martinon F., Burns K. and Tschopp J., 2002, The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1B, Mol. Cell, 10, 9p.

Masters S.L., Lobito A.A., Chae J.J ve Kastner D.L., 2006, Herediter Tekrarlayıcı Ateşlerin Moleküler Patogenezindeki Son Gelişmeler, Curr Opin Allergy Clin Immunol, 6, 5s.

Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T and Sagara J., 1999, ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells, J Biol Chem, 274(48), 8p.

Masumoto J, Kobayashi H, Nakamura T, Kaneko Y, Ota H, Hasegawa M, Kobayashi Y, Suzuki T, Matsuda K, Sano K, Katsuyama T. and Inohara N., 2006, Regulation of the ASC expressionin response to LPS stimulation is related to IL-8 secretion in the human intestinal mucosa, Biochem Biophys Res Commun., 346(3), 5p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, Murase S. and Sagara J., 2001, Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues, J Histochem Cytochem., 49(10), 6p.

Milhavet F, Cuisset L, Hoffman HM, Slim R, El-Shanti H, Aksentijevich I, Lesage S, Waterham H, Wise C, Sarrauste de Menthiere C. and Touitou I., 2008, The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions, Hum Mutat, 29(6), 5p.

Notarnicola C, Didelot MN, Koné-Paut I, Seguret F, Demaille J. and Touitou I., 2002, Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever, Arthritis Rheum.,10, 8p.

Ozen S, Uckan D, Baskin E, Besbas N, Okur H, Saatci U. and Bakkaloglu A., 2001, Increased neutrophil apoptosis during attacks of familial Mediterranean fever, Clin Exp Rheumatol;19(24), 3p.

Ozen S, Hoffman HM, Frenkel J. and Kastner D., 2006, Familial Mediterranean fever (FMF) and beyond: a new horizon. Fourth International Congress on the Systemic Autoinflammatory Diseases held in Bethesda, USA, 6-10 November 2005, Ann Rheum Dis, 65(7), 5p.

Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, Grütter C, Grütter M. and Tschopp J., 2007, The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing, Cell Death Differ., 14(8), 9p.

Peynircioğlu B. ve Yılmaz E., 2006, Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Moleküler Temeli, Hacettepe Tıp Dergisi, 37:6s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pras E., 1992, Mapping Of A Gene Causing FMF To The Short Arm Of Chrosome 16, N. Engl. J. Med.,326, 5p.

Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A. and Gumucio DL., 2001, Interaction Between Pyrin And The Apoptotic Speck Protein (ASC) Modulates ASC-Induced Apoptosis, J Biol Chem., 276(42), 9p.

Schaner PE. and Gumucio DL., 2005, Familial Medietrrenean Fever in the post-genomic era: How An Ancient Disease İs Providing New İnsights İnto İnflammatory Pathways, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(1), 9p.

Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A. and Sagara J., 2002, ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils, Biochem Biophys Res Commun., 293(5), 4p.

Shohat M. and Magal N., 1999, Phenotype-Genotype Correlation in FMF: Evidence For An Association Between Met694Val and Amyloidosis, Euro J Hum Genet., 7, 5p.

Siegal S., 1945, Benign Paroxysmal Peritonitis, Ann. Intern. Med., 23, 21p.

Sohar E., Gafni J., Pras M. And Heller H., 1967 FMF. A survey of 470 cases and review of the literature, N. J. Med., 43, 28p.

Sutterwala FS, Ogura Y. And Flavell RA., 2007, The inflammasome in pathogen recognition and inflammation, J Leukoc Biol., 82(2), 5p.

Stehlik C, Fiorentino L, Dorfleutner A, Bruey JM, Ariza EM, Sagara J. and Reed JC., 2002, The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappaB activation pathways., J Exp Med., 16, 196(12), 10p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Stojanov S. and Kastner D.L., 2005, Familial Autoinflammatory Diseases, Curr Opin Rheumatol, 17, 13p.

The French FMF Consortium, 1997, A Candidate Gene For FMF, Nature Genetics,17, 6p.

The International FMF Consortium, 1997, Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely the cause FMF, Cell, 90, 10p.

Touitou I., 2001, The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations, Eur J Hum Genet., 9(7), 6p.

Touitou I, Notarnicola C. and Grandemange S., 2004, Identifying mutations in autoinflammatory diseases: towards novel genetic tests and therapies?, Am J Pharmacogenomics, 4(2), 9p.

Tufan A, Babaoglu MO, Akdogan A, Yasar U, Calguneri M, Kalyoncu U, Karadag O, Hayran M, Ertenli AI, Bozkurt A. ve Kiraz S., 2007, Association of drug transporter gene ABCB1 (MDR1) 3435C to T polymorphism with colchicine response in familial Mediterranean fever., J Rheumatol,34(7), 4p.

Tunca M. and Ben Chetrit E., 2003, FMF, Pathogenesis and management, Clin Exp Rheu,30, 3p.

Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Tutar E, Ozen S, Topaloglu R, Yilmaz E, Arici M, Bakkaloglu A, Besbas N, Akpolat T, Dinc A. ve Erken E, 2005, Turkish FMF Study Group., Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. Medicine (Baltimore), 84(1), 11p.

Tunca M. ve Ozdogan H., 2005, Molecular and genetic characteristics of hereditary autoinflammatory diseases, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(1), 3p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Turul T. ve Ersoy F., 2004, Dostu Düşmanı Ayıran Bir Doğal İmmünite Bileşeni: Toll Like Reseptörler (TLR), Hacettepe Tıp Dergisi, 35,s .

Wang L, Manji GA, Grenier JM, Al-Garawi A, Merriam S, Lora JM, Geddes BJ, Briskin M, DiStefano PS. and Bertin J., 2002, PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing., J Biol Chem, 16, 277(33), 29874-80p.

Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Kondo C, Konaka K. and Suda T., 2004, PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1, Int Immunol.;16(6), 9p.

www.nzma.org.nz/journal/120-1248/2402/content01.jpg, Erişim tarihi: 05 Mayıs 2010.

Yoshida K., Kanaoka S. And Kajimura M., 2003, A Japanase Case Of FMF With Family History Demonstrating A Mutation in MEFV, Intern Med, 42, 4p.

Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S, Sagara J, Fernandes-Alnemri T. and Alnemri ES., 2006, Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization, Cell Death Differ, 13(2), 12p.

ÖZGEÇMİŞ

SİNEM MELEK NALBANTOĞLU

Contact: Ege Uni. Science & Tech. Center Tel: +90-232-3434400

Adress: 35100 Bornova- IZMIR/TURKEY Mobile: +90-533-8171181

E-mail: nalbantoglusinem@gmail.com

Date of Birth: 15 December 1981

Gender: Female

Education: PhD in Bioengineering Department – Child Hospital Molecular Medicine Laboratory at Ege University Turkey (2006-2010)

MSc in Bioengineering at Ege University Turkey (2004-2006): Investigation on DNA Topoisomerase I Inhibition Effects of the Extracts and Fractions of Some *Alkanna* Species.

Bachelor of Medical Biological Sciences and Genetics, University of Istanbul, Medicine Faculty of Cerrahpaşa (2000-2004): Pelizaeus Merzbacher disease and genetic mechanism, X linked dystrophy, Substantia Alba dismyelination PCR and Southern Blot analyses.

Professional Experience:

Cancer Genetics,

Extraction of active compounds from plants using Open Column Chromatography,

DNA Topoisomerase Enzymes Inhibition Assays, Screening cytotoxic activity of active compounds by MTT Testing in Cell Culture,

PCR, AFLP, RFLP, Southern Blot, Real Time PCR by Light Cycler and Taqman and Hepatitis C Virus RNA Assay bDNA, Reverse Transcriptase PCR, Gel Electrophoresis,

Hepatology Workings: DNA Extraction, Viral Nucleic Acid Extraction,

Assesing Viral Nucleic Acid Copy number,

Genotyping,

Antibiotic Resistance Mutation screening by Sequencing Methods,

Clonning, Gene Transformation to Bacterial Cells, Transfection,

Gene Expression Analysis,

Gene Mapping; determining candidate gene, polymorphism analysis, Plant Molecular Genetics, Plant Transformation, Stress Resistance, Molecular Markers and DNA Fingerprinting Applications.

Trainees:

‘’iGEM 2006 - The international Genetically Engineered Machine competition’’ Brain Storming Member in the name of Aegean University, Turkey.

Hepatitis C Virus: The Virus That Created Hepatology, 11-13 January 2008, The Marmara Hotel, İstanbul, Turkey

Hepatitis B Meeting, December 2007, The Hilton Hotel, İzmir, Turkey

’Genomics and Marker Asisted Selection’’ workshop, 2006, Bioengineering, Ege Uni., İzmir

Latest Developments in Chromatogrophy Workshop, 2006, Bioengineering, Ege Uni., İzmir

The 28th FEBS Meeting, 20-25 October 2002, Istanbul, Turkey

The first Regional Meeting of the Asian Pacific Organization For Cancer Prevention, 14-16 October 2003, Ege Uni. İzmir, Turkey

Microbiology Training, Cerrahpaşa Medicine Faculty, 06.10.03/23.10.03

Molecular Oncology and Genetics Training, Cerrahpaşa Medicine Faculty, 27.10.03/15.01.04

Biochemistry Training, Cerrahpaşa Medicine Faculty, 01.03.04/19.03.04

Immunology Training, Cerrahpaşa Medicine Faculty, 22.03.04/27.05.04

Publications: Pharmacogenomics, Chapter 13, Plants Used in Therapy, Prof. Dr., Ezer Ö., Nobel, 2007.

Symposiums: Effects of naphtaquinones towards topoisomerases, Pharmacy and Bioengineering Faculty, Ege Uni.