

**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEL HASHOMER KRİTERLERİNE GÖRE FMF TANISI ALMIŞ STRIP**  
**ASSAY İLE MUTASYON SAPTANAMAYAN OLGULARIN MLPA**  
**YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**CEM KARAOSMANOĞLU**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. OĞUZ ÇİLİNGİR**

**EYLÜL 2011**



T.C  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TEL HASHOMER KRİTERLERİNE GÖRE FMF TANISI ALMIŞ STRIP  
ASSAY İLE MUTASYON SAPTANAMAYAN OLGULARIN MLPA  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**CEM KARAOSMANOĞLU**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. OĞUZ ÇİLİNGİR**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Cem KARAOSMANOĞLU' nun Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “*Tel Hashomer Kriterlerine Göre FMF Tanısı Almış, Strip Assay Yöntemi İle Mutasyon Saptanamayan Olguların MLPA Yöntemi İle İncelenmesi*” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

12.09.2011

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN

Üye: Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR (Danışman)

Üye: Yrd.Doç.Dr. Cengiz ÜSTÜNER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.10.9.20.11. tarih ve 887.1.41.14. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) kısa aralıklarla tekrarlayan ateş, peritonit, artrit, plörit ve eritem benzeri deri lezyonları ile karakterize otozomal resesif kalıtım gösteren bir otoinflamatuvar hastalıktır. En önemli komplikasyonu amiloidozisdir ve kolşisin tedavisi ile etkin olarak tedavi edilebilir. AAA, özellikle Yahudi, Ermeni, Türk, Arap ve Kuzey Afrika gibi Akdeniz kökenli popülasyonlar üzerinde etkilidir. Çalışmamızda MEFV geninin Strip Assay ile bakılan 12 mutasyon haricinde fenotiple ilişkili diğer mutasyonların taranması amaçlanmıştır.

AAA'dan sorumlu MEFV geni 16. Kromozomun kısa kolunda (16p13.3) pozisyonel klonlama ile tanımlanmıştır. MEFV geni 781 aminoasitlik Pirin/Marenostrin adı verilen bir proteini kodlar. MEFV geni üzerinde şimdiye kadar fenotiple ilişkili 80 farklı mutasyon bildirilmiştir.

Çalışmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına Tel-Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bölümünden gönderilmiş ve Strip Assay ile herhangi bir mutasyon saptanamamış 26 olgu ve sağlıklı 6 birey çalışmaya dahil edilmiştir. P094 probmiksi kullanılarak MLPA yöntemi ile mutasyonlar ve polimorfizmler için incelenmiştir.

Sonuç olarak, MEFV geni promoter ve ekzonlarında herhangi bir mutasyon yada polimorfizm saptanamamıştır. Mutasyon saptanamayan AAA hastaları için MEFV geni regülatör mutasyonlarının gen ekspresyonunu etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), Tel-Hashomer, MEFV, MLPA.

## SUMMARY

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive autoinflammatory disorder characterized by recurrent self-limiting attacks of fever accompanied by sterile peritonitis, arthritis, pleuritis and a typical inflammatory skin rash called erysipelas-like erythema. The main complication of FMF is amyloidosis. As this severe complication can be effectively prevented by treatment with colchicine. FMF mainly affects populations living around the Mediterranean basin, especially Jewish, Armenian, Turkish, Arab and North African. Aim of our study, screening of other mutations in MEFV gene with associated-phenotype except for Strip Assay that is detect 12 mutation.

The gene responsible for FMF, designated MEFV was identified by positional cloning. MEFV gene is located on the short arm of the chromosome 16 (16p13.3) that encodes a 781 amino acid protein known as pyrin/marennosin. So far 80 different associated-phenotype mutations have been detected on MEFV gene.

In this study, we aimed to investigate with MLPA in 26 FMF patients referred to ESOGU Internal Disease/Rheumatology Department to ESOGU Medical Genetic Department according to Tel-Hashomer criteria who couldn't mutations by Strip Assay in exons. As a control group 6 healthy individuals used. MEFV gene investigated with P094 probemix for mutations and polymorphisms.

In conclusion, we didn't detect any mutations or polymorphisms on MEFV gene promoter and exons. We think MEFV gene regulatory mutations may affect gene expressions for any detect mutations on FMF patients.

Key words: Familial Mediterranean Fever, Tel-Hashomer, MEFV, MLPA.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL VE ONAY SAYFASI</b> .....	iv
<b>ÖZET</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Tanımı.....	3
2.2. Tarihçe.....	3
2.3. Epidemiyoloji.....	4
2.4. Pirin/Marenostrin Proteini Yapısı.....	5
2.5. Patogenez.....	7
2.6. AAA Genetiği.....	11
2.6.1 MEFV geni.....	11
2.6.2. MEFV geni mutasyonları.....	12

2.6.3. MEFV mutasyonlarının fenotipik etkileri.....	13
2.6.4. MEFV mutasyonlarının populasyon dağılımı.....	14
2.7. Klinik Bulgular.....	15
2.7.1. Ateş.....	16
2.7.2. Karın ağrısı.....	16
2.7.3. Plörezi.....	16
2.7.4. Perikardit.....	17
2.7.5. Artrit.....	17
2.7.6. Miyalji.....	17
2.7.7. Cilt bulguları.....	17
2.7.8. Splenomegali.....	18
2.7.9. Vaskülit.....	18
2.7.10. Amiloidoz.....	18
2.8. Laboratuvar Bulguları.....	19
2.9. Tel-Hashomer Tanı Kriterleri.....	19
2.10. Tedavi.....	20
2.11. MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification).....	21
2.11.1. SALSA MLPA P094 (lot 1206) MEFV Prob Kiti.....	24
2.11.2. AAA'da Strip Assay uygulaması ve MLPA yöntemi ile farklılıkları....	25
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materyal Seçimi.....	27
3.2. Kullanılan Gereçler.....	27



3.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	28
3.4. Magna Pure Compact Ekstraksiyon Robotu İle DNA Eldesi.....	28
3.5. Elde Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemi İle İzolasyonu.....	29
3.5.1. Denatürasyon ve hibridizasyon.....	29
3.5.2. Ligasyon reaksiyonu.....	29
3.5.3. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu).....	30
3.5.4. ABI 3130 Genetic Analyser cihazına yükleme.....	30
3.5.5. Değerlendirme.....	32
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
4.1. MEFV Geninde Saptanan Bulgular.....	37
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>42</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>47</b>
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>60</b>

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1:</b> AAA hastalığının populasyonlarına göre MEFV mutasyon dağılımı.....	15
<b>Tablo 2.2:</b> Livneh ve ark. Tarafından AAA tanısına yönelik Tel-Hashomer kriterleri.....	20
<b>Tablo 2.3:</b> MLPA P094 Probmiksi.....	24
<b>Tablo 4.1:</b> Eksternal kontrole ait pik alanları.....	37
<b>Tablo 4.2:</b> Normal olguya ait pik alanları.....	38
<b>Tablo 4.3:</b> Çalışılan olgulara ait coffalyser programında değerlendirilen doz oranları.....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1:</b> AAA hastalığı yayılımı.....	5
<b>Şekil 2.2:</b> Pirin Proteini Bölümleri.....	6
<b>Şekil 2.3:</b> Pirin proteinin rolü ve inflamasyon hipotezi.....	8
<b>Şekil 2.4:</b> Kaspaz-1 ile Pirin Etkileşimini Gösteren bir model.....	9
<b>Şekil 2.5:</b> MEFV geni 16. Kromozomun kısa kolunda 16p13.3 bölgesinde lokalize olmuştur.....	11
<b>Şekil 2.6:</b> MEFV geni ve mutasyonlarının dağılımı.....	12
<b>Şekil 2.7:</b> MLPA hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamaları.....	22
<b>Şekil 2.8:</b> AAA Strip üzerinde ki kontroller, mutant tip ve normal tipe ait renkli hibridizasyon çizgileri.....	25
<b>Şekil 3.1:</b> MLPA pik görüntüleri. X eksenini alınan floresan sinyal değeri, ortalama olarak en kısa prob en uzun probun 1/3 kadar uzunluğa sahip olmalıdır. Y eksenini prob uzunluklarını (nt olarak) göstermektedir.....	31
<b>Şekil 4.1:</b> Normal örnekte yaklaşık 50 ng DNA ile gerçekleştirilmiş MLPA reaksiyonunun pik görüntüsü.....	35
<b>Şekil 4.2:</b> Kaliteli DNA elde edemediğimiz örneğe ait pik görüntüleri.....	36
<b>Şekil 4.3:</b> Eksternal kontrole ait MLPA Salsa P094 prob pik görüntüleri ve prob uzunlukları (size, nt olarak).....	36

**Şekil 4.4:** Normal olguya ait pik görüntüleri ve prob uzunlukları (size, nt olarak).....38

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>AAA</b>	Ailevi Akdeniz Ateşi
<b>ASC</b>	Apoptoz ilişkili speck protein
<b>C5a</b>	Complement Factor 5a
<b>CAD</b>	Caspase Recruitment Domain
<b>CRP</b>	C-reactive Protein
<b>DAMP</b>	Danger-associated Molecular Patterns
<b>Del</b>	Delesyon
<b>Kb</b>	Kilobaz
<b>MLPA</b>	Multiplex Ligase-Dependent Probe Amplification
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleic Acid
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NLRP3</b>	NOD-like reseptör family, pyrin domain containing 3
<b>nt</b>	Nükleotid
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

<b>PYD</b>	Pirin domaini
<b>SAA</b>	Serum Amiloid A
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrosiz Faktör Alfa
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), kısa süreli tekrarlayan ataklar ve seröz zarların inflamasyonu ile karakterize otozomal resesif kalım gösteren bir hastalıktır (14). Hastalık tipik olarak tekrarlayan ateş ve poliserozit atakları ile seyreder. Hastalığın en önemli komplikasyonu amiloidozdur. Hastalık başlıca Türk, Arap, Ermeni, Musevi ve etnik kökeni Akdeniz olan toplumlarda sıklıkla görülür (2).

Atakların sıklığı ve süresi hastadan hastaya değişiklik gösterir. Atak süresi ortalama olarak 1-3 gün arası sürer. Türklere hastalığın görülme sıklığı 1/1000'dir. Taşıyıcılık oranı 1/5 dir. Bu bakımdan her 5 kişiden 1'i taşıyıcı konumundadır (32,63).

Ailevi Akdeniz Ateşi AAA'dan sorumlu olan MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3 bölgesinde pozisyonel klonlama tekniği ile 1997 yılında Uluslararası AAA konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumunun bağımsız çalışmaları ile klonlanmıştır (45). MEFV geni 781 aminoasitten oluşan Pirin/Marenostin olarak bildirilen proteini kodlamaktadır. Bu proteinin fonksiyonunu tam olarak bilinmemektedir. Ancak AAA atakları sırasında inflamasyon bölgesine nötrofillerde ifade bulunduğu ve inflamasyonun inhibe edilmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (20). Pirin/Marenostin proteininden başka bu proteinin yapısına benzer başka proteinlerde tanımlanmış ve diğer inflamasyon hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. AAA'nın diğer inflamasyon hastalıkları ile klinik olarak benzerliğinden dolayı ayırım yapılarak tanı koymak zordur.

Günümüze kadar MEFV geni için 208 farklı genomik değişiklik tespit edilmiştir (50). Bu genomik değişikliklerin yaklaşık 80 tanesi AAA fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. MEFV geninde oluşan mutasyonların büyük çoğunluğu, aminoasit değişikliğine sebep olan yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. 2 insersiyon, 2 delesyon, 2 duplikasyon ve geri kalan yer değiştirme (substitution) mutasyonlarıdır (50). Bu mutasyonlar Pirin proteinin yapısını değiştirir. Ülkemizde en sık görülen mutasyonlar, M694V, M680I, V726A, M694I ve E148Q mutasyonlarıdır (63).

Ülkemizde MEFV gen değişimleri araştırması genellikle Strip Assay yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntemle M694V, M680I(G/C), V726A, E148Q, P369S, F479L, M680I(G/A), I692del, M694I, K695R, A744S ve R761H mutasyonu olmak üzere 12 mutasyona bakılmaktadır. Bu nedenle MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) yöntemi kullanılarak Strip Assay yöntemi ile mutasyon saptanamayan Tel-Hashomer kriterlerine göre AAA hastası olan olgularda var olabilecek diğer genomik değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Tanımı

Ailevi Akdeniz ateşi otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Tekrarlayan kısa süreli ataklar, karın ağrısı, göğüs ağrısı, eklem ağrıları ve eritem benzeri deri lezyonları ile karakterizedir. Hastalığın en belirgin komplikasyonu böbrek yetmezliğine neden olan amiloidozdur . Ailevi Akdeniz ateşinin klinik çeşitliliği oldukça geniştir. Hastalık belirtileri hafif semptomlardan ciddi ve yaşamı tehdit eden semptomlara kadar çeşitlilik gösterir (1). FMF Akdeniz kökenli bir hastalık olup Araplar, Ermeniler, sefardik Yahudilerde yaygın olarak görülür (2, 3). İspanyol, İtalyan, Yunan, Portekiz, Kürt ve askenize Yahudilerde yaygın değildir (4).

Hastalığın ağrılı ve ateşli olarak seyretmesi AAA'nın ayırıcı ve en belirgin özelliğidir. 38.5-40 °C' ye varan ateş ile karın, göğüs yada büyük eklem bölgelerinde inflamasyondan dolayı ağrı görülür. Ataklar kısa sürelidir ve 1-3 gün arası sürer ve tedaviye gerek kalmadan geçer. Hastalar bir sonraki atak başlayana kadar normal fonksiyonlarını geri kazanır. Tekrar eden ataklar tahmin edilemeyen sırada ve düzensiz aralılarla gerçekleşir (5).

### 2.2. Tarihçe

Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığı ilk olarak 1908 de Janeway ve Mosenthal tarafından 16 yaşında ki bir Yahudi kızda tekrar eden karın ağrısı ve ateş şeklinde karakterize edilmiştir. Daha sonra klinik olarak bütünlüğü Amerikalı allerjist olan Siegal tarafından oluşturulmuştur. Siegal 11 vakada ateş, akut karın ve göğüs ağrısı tespit etmiş ve ikincil bir peritonel ve pleural inflamasyon bulunduğunu ortaya koyarak bu durumu "Benign Proksimal Peritonitis" olarak isimlendirmiştir. 1948 yılında Reimann proksimal peritonit içeren hastalar için "Periyodik Hastalık" tanımlamasını kullanmıştır. 1952 yılında Mamou ve Cattan sefaradik Yahudilerden

hastalığın ailevi olduğunu belirtmişlerdir. 1958 yılında Heller ve Sohar hastalığın Akdeniz orjinli olduğunu belirtmiş ve İsrail de ki çalışma arkadaşları ile birlikte sendromu “Ailevi Akdeniz Ateşi” olarak tanımlamışlardır (6, 7). 1961 yılında yine Heller ve Sohar hastalığın otozomal resesif olarak kalıtıldığını göstermişlerdir (8). 1972 yılında Goldfinger tarafından kolşisin kullanımı ile hastalık ataklarını ve amiloidozu önlediği gösterilmiştir (9). Tedavide kolşisinin kullanımı ve hastalığın klinik özelliklerinin belirlenmesinden sonra Ailevi Akdeniz Ateşi'nin genetik özellikleri ortaya konmuştur. 1992 yılında bağlantı analizi çalışmaları ile Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde Ailevi Akdeniz Ateşi gen lokusunun 16. Kromozomun kısa kolunda gösterilmiştir (10). Amerika Birleşik Devletleri, İsrail ve Avustralya dan katılan çalışma grupları Uluslararası AAA Konsorsiyumunu oluşturmuşlardır. Aynı zamanda ikinci bir konsorsiyum da Fransız ve İsrail araştırmacılar ile Fransız AAA konsorsiyumu adı altında kurulmuştur. Bu iki konsorsiyumda 1997 yılında eş zamanlı olarak AAA genini bulmuşlar ve MEFV (mediterranean fever) olarak adlandırmışlardır (11). Bu genin proteini Amerikan grubu tarafından Pirin, Fransız araştırma grubu tarafından Marenostin olarak adlandırılmıştır (7).

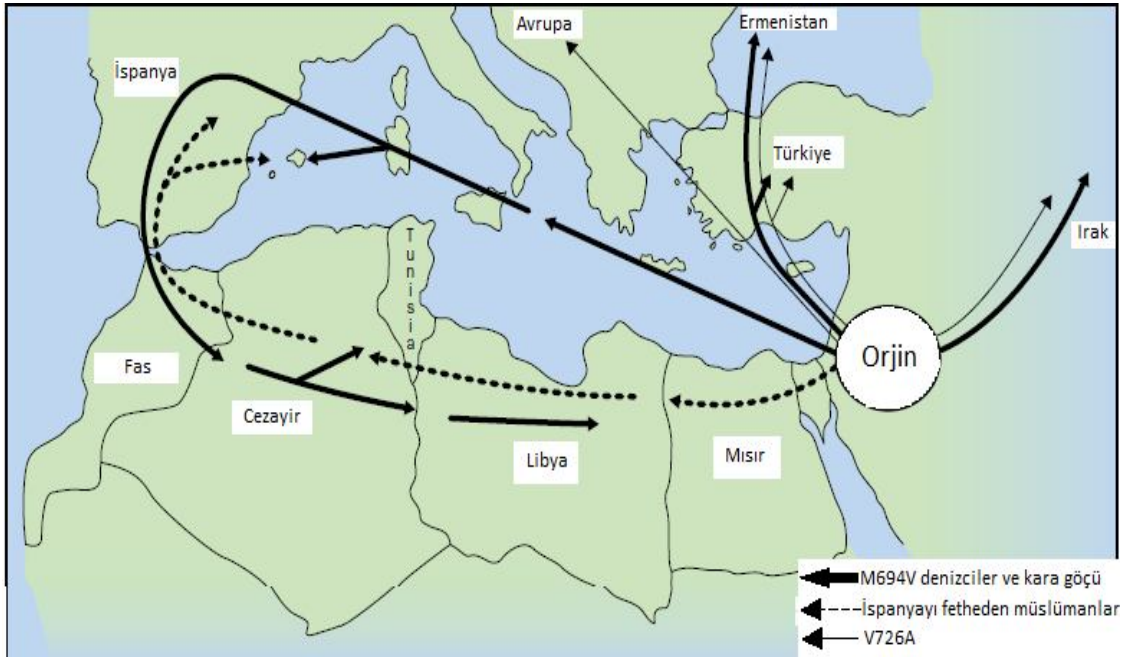
### **2.3. Epidemiyoloji**

Ailevi Akdeniz Ateşi, otozomal resesif kalıtım gösterir ve dünya üzerinde tahmini 100,000 ile 170,000 arasında insanı etkiler. Böylelikle en genel kalıtsal periyodik ateş hastalığıdır. AAA, genel olarak etnik kökeni Akdenize dayanan ırklar arasında yayılım gösterir. Ermeniler, Araplar, Türkler, askenazi (Almanya kökenli) olmayan Yahudiler arasında oldukça yaygındır. Dünya geneline de 20. Yüzyılda gerçekleşen aşırı insan nüfusunun göçleri ile yayılmıştır. Batı Avrupa, Brezilya, Çin, Avustralya, Yeni Zelanda ve Japonya da az sıklıkla olsa da görülmüştür (7,12).

AAA, prevalansı Askenazi olmayan Yahudilerde 1/250 den 1/500 arasında değişmektedir (13). Lübnan da yaşayan Ermenilerde prevalans 1/500 olarak bulunmuştur (11). Türklerde tahmini prevelans 1/1000 olarak bulunurken taşıyıcılık oranı ise 1:5 olarak hesaplanmıştır (14). Türklerde en sık görülen mutasyonlar sıklık

sirasına göre M694V (%51), M680I (%14), ve V726A (%8) dir (14). Taşıyıcılık oranı Askenazi olmayan Yahudilerde 1:5 ile 1:16 arasında, Araplarda 1:5 ve Ermenilerde de 1:7 oranında saptanmıştır (12). Kadınlar ve erkekler hastalıktan eşit oranda etkilense de erkeklerde daha sıklıkla rastlanılmaktadır (7).

M694V, V726A ve E148Q en eski mutasyonlardır. 2500 yıl önce Mezopotamya da ortaya çıktığı düşünülmektedir. Şekil 2.1 de gösterildiği gibi bu mutasyonların yayılımı M694V'nin İspanyayı fetheden Müslümanlar ve denizciler ile kara göçü yoluyla V726A mutasyonu ise Mezopotamya dan Türkiye, Ermenistan ve Avrupa'ya yayılmıştır (11).



Şekil 2.1: AAA hastalığı yayılımı (11)

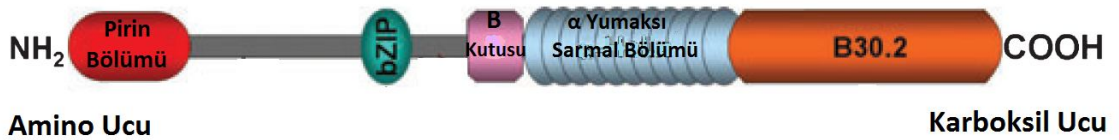
#### 2.4. Pirin/Marenostrin Proteini Yapısı

Pirin/Marenostrin proteini MEFV geni tarafından 781 aminoasitlik bir protein olarak kodlanır (26). İsim olarak Latin ve Yunan temellidir. Pirin Yunanca da ateş, marenostrin ise Latince de Akdeniz anlamına gelmektedir (27). Pirin, apopitoz ve

inflamasyon regülasyonunda yer alan proteinler sınıfına aittir. AAA da ki rolü tam anlamıyla anlaşılmamıştır (20). Pirin proteini nötrofillerde ve daha az olarak eozinofil ve monositlerde eksprese olur. Lenfositlerde ise eksprese olmaz (17).

Yapısal olarak pirin Death Fold süperfamilyasının bir üyesidir. Amino ucunda ki PYD Bölgesi, Death Bölümü (DD), Death Efektör Bölümü (DED) ve Caspase Recruitment Bölümü (CARD) ile benzerlik gösterir (4). Bütün bu bölümler protein-protein etkileşimlerine katılırlar (4, 19). DD, DED ve CARD bölümlerini taşıyan proteinler apoptoz ve inflamasyon sinyal yolu için önemlidir (28). Bu bölümler belirli alt düzeyde ki genlerin aktivasyonuna yol açan sinyal molekülleri arasında tek tip protein protein etkileşimlerine aracılık ederler. Bu bölgeler kaspaza benzer reseptörden efektöre sinyallerin düzenlenmesi ve iletilmesi için gereklidir (29).

Şekil 2.2 de Pirin proteininin beş farklı bölümü tanımlanmıştır. Bu bölümler, Pirin bölümü (Pyr, Amino ucu Bölgesi), bZIP transkripsiyon faktörü temel bölümü, B kutusu olarak adlandırılan bir veya iki çinko bağlayıcı bölüm,  $\alpha$ -yumaksı sarmal bölüm ve B30.2 (PRYSPRY) bölümüdür. Her bölümün farklı görevleri vardır. Hücre ölümü regülasyonu, sitokin salınması, transkripsiyonel regülasyon ve hücre iskelet sinyali ile inflamasyon bağlantılı protein-protein etkileşimlerinde bulunurlar (4).



Şekil 2.2: Pirin Proteini Bölümleri (4)

## 2.5. Patogenez

AAA hastalığının da serozal dokuları etkileyen (plevral, periton, sinovyal) inflamasyon en belirgin özelliğidir. Ataklar sırasında polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik aktivitesi büyük oranda artmıştır ve etkilenmiş dokulara granülositlerin büyük bir akımı vardır (7, 11). İnflamasyon bölgesine gelen nötrofillerden kemotaktik faktörlerin salınmasıyla bölgeye daha fazla sayıda nötrofil toplanması sağlanır ve inflamasyonun şiddeti artar. AAA'lı hastalarda nötrofillerin normalden fazla miktarda lizozom salgıladıkları bulunmuştur (15). AAA hastaları ile AAA'lı olmayan bireyler karşılaştırıldığında da nötrofillerin herhangi bir morfoloji ve kemotaksis olarak farklılık olmadığı görülmüştür (17).

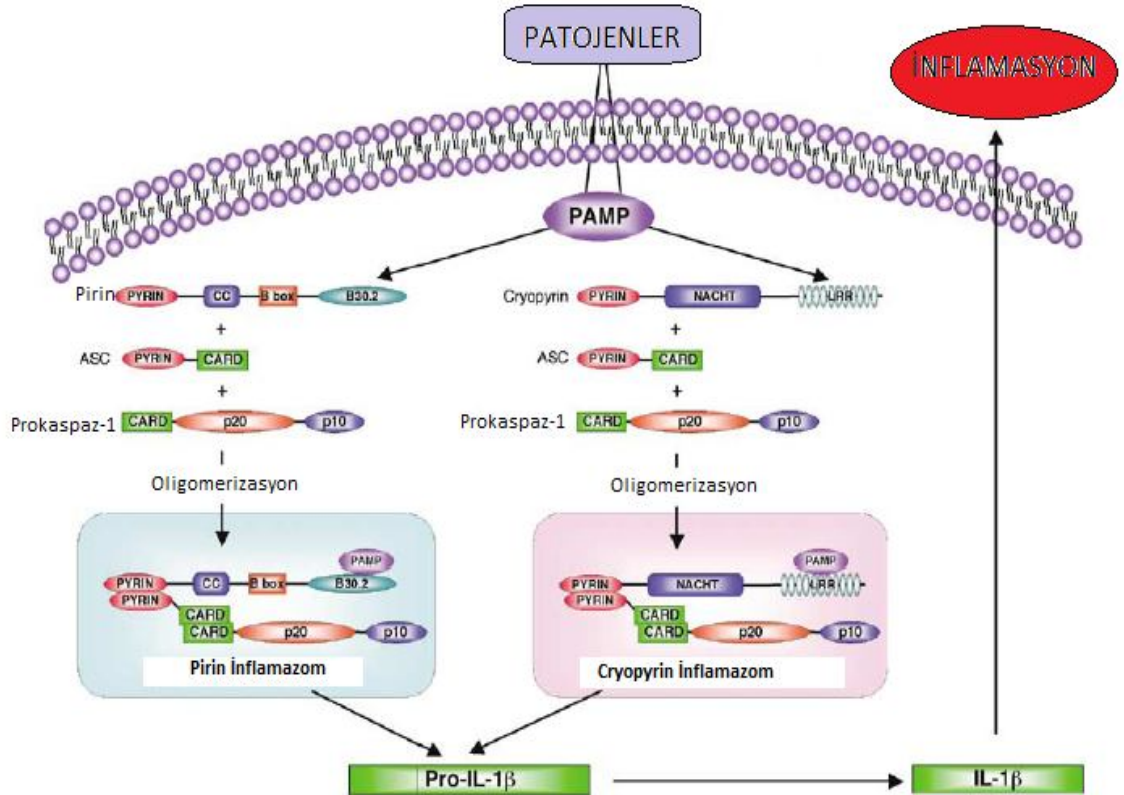
(IL)-6, IL-8, tümör nekrozis faktör (TNF)- $\alpha$  ve IL-2 reseptör seviyeleri AAA patogenezinde artmış olarak bulunmuştur. Bunun yanında makrofaj inflamasyonel protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) da AAA akut atak sırasında artmış, fakat remisyonda normal olarak tespit edilmiştir (18). Akut atak sırasında IL-1 aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. TNF- $\alpha$  ve IL-1 reseptör antagonisti IL-1 $\beta$  konsantrasyonu ataksız dönemlere göre ataklarda artış olduğu gösterilmiştir. IL-6 düzeyinde de artış bildirilmiştir (15).

TNF- $\alpha$ 'nın AAA' da ki rolü tam olarak belli değildir. Ataklar sırasında düzelleme veya hafif yükselme, ataklar arasında ise normal yada artmış seviyeler tespit edilmiştir. TNF- $\alpha$  ile MEFV geninin regülasyonunun arttığı bilinmektedir. AAA tedavisinde anti-TNF ajanların etkili olabileceğini göstermektedir (26).

Pirin proteini AAA dan sorumlu MEFV geni tarafından kodlanır. Pirin proteininin Amino ucu 92 aminoasitten oluşur ve apoptoz ve inflamasyonla ilgili birçok proteinle benzerlik gösterir (16). Amino ucu pirin bölümü (Pyd) içerir. Şekil 2.3 de gösterildiği gibi Pyd bölümü apoptoz ile ilişkili speck protein ASC ile etkileşime girer. ASC içerdiği pyd bölümü sayesinde diğer pyd içeren proteinler ile ilişkiye girer. Pirin proteininin pyd bölümü death domain fold ailesinin üyesidir. Death bölümü (DD)

üyelerinden CARD (caspase recruitment domain) bölümü ASC proteinin karboksil ucunda yer alır (4). ASC CARD bölümü IL-1 $\beta$  işlenmesi ve prokaspaz-1 etkileşiminde yer alır. ASC prokaspaz-1'e bağlanarak aktivasyonunu sağlar, aktif kaspaz-1 pro-IL-1 $\beta$ 'yı IL-1 $\beta$ 'ya çevirir ve salgılanan IL-1 kendi reseptörüne bağlanarak inflamasyonu başlatır (20).

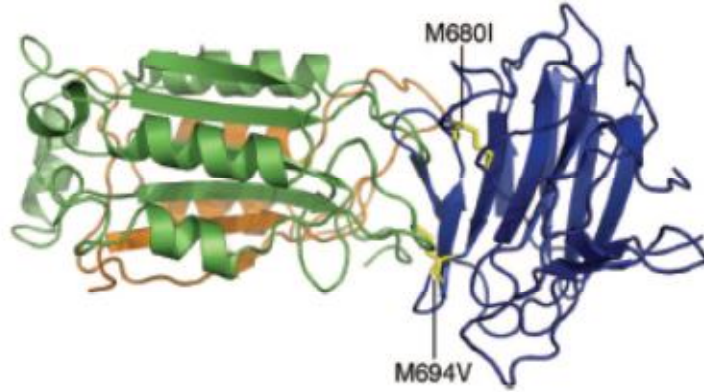
İnflamazomlar PAMP (pathogen-associated molecular patterns) yada DAMP (danger-associated molecular patterns) olarak adlandırılan moleküller tarafından aktif hale getirilip pro-IL-1 $\beta$ 'yı aktif IL-1 $\beta$  haline çeviren sitoplazmik multiprotein kompleksleridir. NLRP3 (cyropyrin), ASC ve prokaspaz-1 multimerleri NLRP3 inflamazomunu oluşturur. Prokaspaz-1 moleküllerinin birbirlerini aktifleştirerek aktif kaspaz-1'i oluşturur. Aktif kaspaz-1 pro-IL-1 $\beta$ 'in aktif bir sitokin olan IL-1 $\beta$ 'ya dönüşümü ile IL-1 $\beta$  aracılı inflamasyon gelişir (70).



Şekil 2.3: Pirin Proteinin rolü ve inflamasyon hipotezi (34)

Yabancıl tip pirin proteini ile ilişkide olan ASC proteini kaspaz-1 ile etkileşimde bulunarak apoptozu başlatır. Mutant tip pirin proteininde bu mekanizma gerçekleşmeyeceği için inflamasyon kontrol edilemeyecektir (19). Pirin proteini ile NF- $\kappa$ B yolağı gibi apoptozdan sorumlu sinyal proteinleri ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinler arasında ilişki olduğu düşünülmektedir (20).

Çeşitli ekspresyon çalışmalarına göre AAA hastalarının periferik kan lökositlerinden elde edilen MEFV mRNA'nın asemptomatik periyotlar süresince ekspresyonunun azaldığı ve IL-1 $\beta$ 'nin yükseldiği gözlenmiştir (22). Bu bulgular, pirin proteinin bir inhibitör olduğunu ve temel fonksiyonunun inflamasyonunun negatif regülatörü olarak rol oynadığını göstermektedir. Chae ve arkadaşları çalışmalarında, IL-1 $\beta$  aktivasyonunun regülasyonunda pirinin ASC'den bağımsız bir rolünün olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Kaspaz-1 ile birbirini etkileyen B30.2 bölümünün ve olduğu farzedilen bağlanma alanının ara yüzeyine lokalize olmuş M680I ve M694V mutasyonlu örneklerde bozulmuş interaksiyonu kristal yapı modeli ile şekil 2.4 de gösterilmiştir (20).



Şekil 2.4: Kaspaz-1 ile Pirin Etkileşimini Gösteren bir model. Pirinin B30.2 bölümü (mavi), kaspaz-1'in kristal (p20 yeşil, p10 kahverengi) yapısına girer. AAA'ya neden olan 2 yaygın mutasyon, varsayılan bu bağlama ara yüzeyinde lokalize olmuştur (19).

MEFV geninde ki mutasyonlar sonucu pirin proteinin normal görevini yerine getirememesinden dolayı kontrol edilemeyen nötrofil aktivasyonu ve serozal dokulara

nötrofil göçü olabilir. Fakat serozal dokuların neden AAA inflamasyonunun ana hedefi olduğu belirsizdir (11).

Öne sürülen hipotezlerden biride inflamasyonun biyosentezine aracılık eden bir lipokortin proteinin eksikliğine bağlı olarak AAA'nın konjenital bir hastalık olduğuna yöneliktir (11). Lipokortin proteinlerinden birinin eksikliği halinde katekolamin salınımı gibi adenilat siklaz aktivitesini artıran her uyarımın lipokortinlerin inhibe edici etkisinin olmaması nedeniyle inflamasyona neden olabileceği düşünülmüştür (21).

Diğer bir hipoteze göre de patogenezin katekolamin metabolizması ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Fiziksel duygusal stres atakları tetikleyebilir. AAA'nın metaraminol infüzyon akut ataklara sebep olabileceğinden dolayı katekolamin metabolizması ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (11).

Günümüzde en kabul gören bu hipotez, AAA'nın peritoneal sıvı ve C5a aktivitesinin eklemlerde yetersizliğinden kaynaklandığıdır. Şekil 2.5 de gösterildiği gibi araştırmacılar, granülositler için oldukça güçlü bir kemoatraktan olan C5a'yı inhibe eden inhibitör eksikliğinin akut inflamasyona neden olabileceğini bildirmişlerdir. Sağlıklı kişilerin sinoviyal ve peritoneal sıvıları C5a'nın kemotaktik aktivitesini engelleyen bir inhibitör protein taşırlar. Bu protein normal şartlarda aktive olan C5a'yı inhibe eder ve inflamasyonu kontrol eder. Eksikliğinde ise seröz zarlarda inflamasyon ortaya çıkar (23). Matzner normal pirinin C5a/IL-8 inhibitör faktörünü biyosentezini aktive ettiği hipotezini ortaya atmışlardır (24). Bundan dolayı inflamasyon sonrası açığa çıkan kemotaktik faktörleri inhibe edebilecek yeterli inhibitör olmaması sonucu MEFV mutasyonlarının AAA ataklarına yol açacağı öne sürülmüştür (15,25).

Pirin proteinin inflamasyon oluşumda IL-1 $\beta$  aktivasyonuna artırıcı yada azaltıcı etki yaptığı bilinen bir gerçektir. Fakat bu etkinin artırıcı mı azaltıcı mı olarak geliştiği tam olarak bilinmemektedir. Pirin proteinin proinflamatuvar olarak ve MEFV geninde de bir fonksiyon kazandırıcı bir mutasyon olduğu düşünüldüğünde AAA'nın dominant olarak kalıtıldığı aynı zamanda pirin proteinin antiinflamatuvar olarak ve MEFV geninde

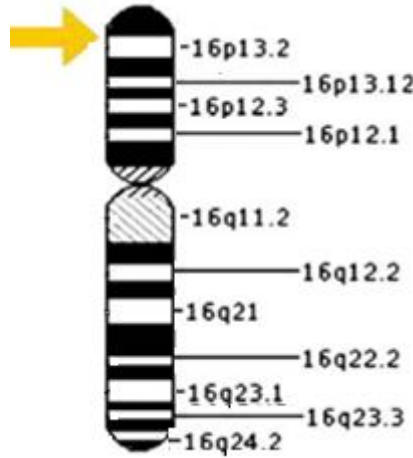


de fonksiyon kaybettiren bir mutasyon olduğu düşünülürde hastalığın resesif olarak kalıtıldığı düşünülebilir. Bu sebeplerden ötürü pirin proteinin inflamasyonda ne şekilde etki ettiği ve AAA kalıtımın şekli kesin olarak bilinmemektedir (71).

## 2.6. AAA Genetiği

### 2.6.1. MEFV geni

1992 yılında 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalizedir (Şekil 2.5). AAA geni, Fransız AAA Konsorsiyumu ve Uluslararası AAA Konsorsiyumu'nun eş zamanlı çalışmaları ile 1997 yılında moleküler dizisi pozisyonel klonlama tekniği ile bulunmuştur (45,46).



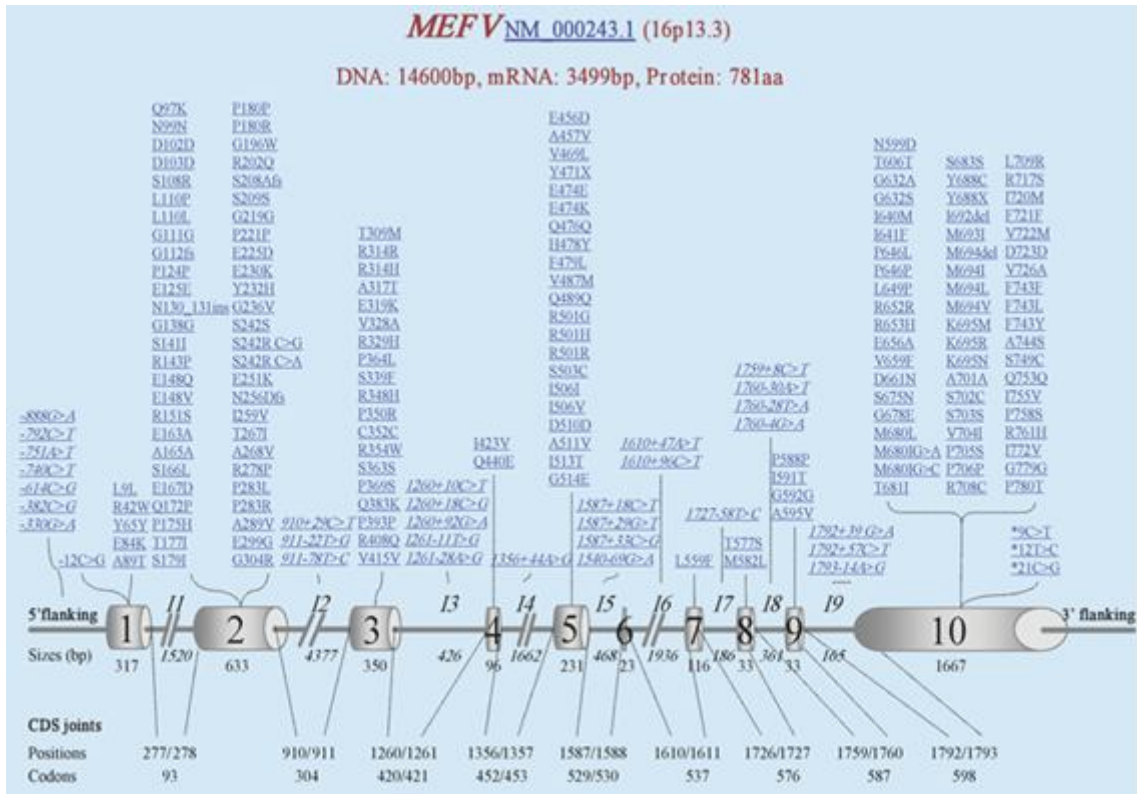
Şekil 2.5: MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3 bölgesinde lokalize olmuştur (47).

MEFV geni 10 ekzon, 9 intron, 15Kblik ve 3505 nükleotidden oluşan bir gendir (48). MEFV geni pirin/marenostri proteinini kodlar (26). MEFV geni otozomal resesif kalıtım gösterir (47). AAA hastalığına sahip tüm hastalar otozomal resesif kalıtıma sahip değildirler. Tek allelde ki bir mutasyon nedeniyle de yani heterozigot MEFV genine sahip AAA hastaları da rapor edilmiştir. Tek allel mutasyonuna sahip AAA hastaları oranı %16-34 arasında değişir (64). Heterozigot MEFV mutasyonlu hastalar orta şiddette inflamasyon reaksiyonu gösterirler (65). Heterozigot AAA hastalarını

homozigot mutasyonlu hastalardan klinik olarak ayırt etmek olanaksızdır. Heterozigot AAA hastaların da kısmi penetrans ve değişken gen ekspresyonu ikinci mutasyonun olmamasını açıklayabilir (66).

## 2.6.2. MEFV geni mutasyonları

Mutasyonların dağılımı genellikle 2, 3, 5 ve 10. ekzondadır (51). Tanımlanan mutasyonların çoğunluğu nükleotid yer değiştirmesi şeklindedir ve genellikle 10. ekzonda yer alır (49). 2011 yılı AAA veri tabanında 208 gen değişimi bildirilmiştir (şekil 2.6) (50). 10 ekzonda ki M694V, V726A, M680I, V694I ve 2. ekzonda ki E148Q mutasyonları tüm AAA mutasyonlarının %74'ini oluşturur. AAA hastalarının büyük çoğunluğundan hangi etnik köken olursa olsun M694V, V726A, M680I, V694I mutasyonları sorumludur. Bu dört yanlış anlamlı mutasyon pirin proteinin karboksil ucu bölgesinde bulunmaktadır (53).



Şekil 2.6: MEFV geni ve mutasyonların dağılımı (51)

### 2.6.3. MEFV mutasyonlarının fenotipik etkileri

AAA genetiği çalışmalarında elde edilen sonuçlar göre, fenotipik varyasyonların belirli mutasyonlar ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. AAA hastalığı otozomal resesif geçiş gösterir, az da olsa bazı ailelerde otozomal dominant geçiş gösterdiği de olmuştur. Bu dominant geçiş moleküler olarak taşıyıcı oranının yüksek olması, AAA tarafından etkilenmiş akraba evliliği, daha şiddetli etkiye sebep olan bazı mutasyonların varlığı ile açıklanır (53).

MEFV geni allellerinde bulunan mutasyonlara göre üç ayrı fenotip tanımlanmıştır.

**1 Fenotip I** (Belirgin AAA): Hastalıkla ilgili çoğu belirti, M694V mutasyonu başta olmak üzere, sık rastlanılan mutasyonların gözlemlendiği ve bu mutasyonlar ile klinik tablonun ağırlaşma eğilimi arasında ilişki bulunan hastalar.

**2 Fenotip II** (izole amiloidoz): İlk veya tek belirti olarak amiloidozu bulunan ve M694V mutasyonuna çok rastlanan hastalar.

**3 Fenotip III** (Sub/Pre-klinik AAA): Klinik olarak hasta olmayan ancak MEFV mutasyon taşıyıcısı olanlar.

Üçüncü fenotip grubunda genellikle E148Q ve V726A mutasyonlarına rastlanılmaktadır. Bu fenotip grubunda ki kişiler ilk iki fenotipe sahip olan hastalara oranla daha fazla sayıdadır ve bu fenotipin oraya çıkışını etnik köken etkilememektedir (54).

AAA hastalığına sahip çeşitli etnik gruplarla yapılan ilk çalışmalarda M694V homozigot mutasyonuna sahip hastalarda tam penetrans ve yüksek amiloid gelişme riski saptanmıştır. Yahudiler ve Ermenilerde ise mutasyonun homozigot olması ile hastalığın şiddeti arasında ilişki bulunamamıştır (55). Ayrıca M694V homozigot genotipine sahip kolşisin tedavisi görmeyen hastalarda amiloid gelişimine ek olarak hastalığın erken

yaşta çıkması, artrit in daha sıklıkla görülmesi ve plörezinin daha yaygın olması hastalığın daha şiddetli formu ile ilişkilendirilmiştir (56). Ermeniler ,Araplar ve Yahudilerde M694V homozigot mutasyonu amiloid gelişimi açısından risk faktörü olarak belirtilmesine karşın M694V mutasyonu dışında mutasyon taşıyan hastalarda da amiloid gelişimi bildirilmiştir (30). Türklerde is Yalçınkaya ve ark. yaptıkları genotip-fenotip çalışmalarında M694V homozigot mutasyonun amiloid gelişimi ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (55). Ancak bu çalışmadan sonra Yılmaz ve ark. yaptığı çalışmada ise böyle bir ilişkiden söz edilmektedir (57).

E148Q mutasyonu en sık rastlanılan 5 mutasyondan biridir. Bazı durumlarda klinikle ilişkisiz polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Bu mutasyon başka bir mutasyonla birlikte hastalığın oraya çıkmasına neden olabilir (59). E148Q mutasyonu hastalığı daha hafif genotipi ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonun klinik bulguları değişkenlik göstermesine karşın kolşisin tedavisine başlanması önerilmiştir (61).

M694I veya M680I homozigot olan hastalarında M694V homozigot mutasyonu taşıyan hastalar gibi aynı hastalık şiddetine sahip oldukları belirtilmiştir (55). M680I mutasyonu Türklerde daha az sıklıkla rastlanılmaktadır. Tüzün ve ark. toplam 110 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, periyodik göğüs ağrısına sahip 16 hastanın 8'inde (%50) M680I mutasyonun görüldüğü ve aritriti buluna 24 hastanın ise 22'sinde (%91) M694V mutasyonu saptamışlardır.

#### **2.6.4. MEFV mutasyonlarının popülasyon dağılımı**

Yılmaz ve ark. Türk popülasyonunda en sık görülen 5 mutasyonun dağılımı M694V %51.5, M680I %9, V726A %2.9, M694I %0.4 ve E148Q %3.5 oranlarında saptamışlardır (63). Bakkaloğlu'nun yaptığı çalışmada ise mutasyon dağılımı M694V %51, M680I %14 ve V726A %9 oranlarında saptanmıştır (32). M694V mutasyonu Akdeniz mutasyonu olarak bilinir ve Türkler, Ermeniler, Araplar ve Sefardik (İspanya kökenli) Yahudiler arasında saptanmıştır. Bu mutasyonun haplotip analizleri 2000 yılı aşkın bir süredir belirli etniklerde varlığını korumaktadır. AAA hastalığında nadir

görülen mutasyonlar genellikle hastalığın çok görülmediği Avrupalılar arasında mevcuttur. AAA hastaları homozigot mutasyon taşıyanlar yada iki allelde farklı iki mutasyon taşıyan yani bileşik heterozigot olan bireylerdir (60). Çeşitli etnik gruplarla ait AAA hastaları ile yapılan çalışmalar sonucu mutasyon dağılımı tablo 2.1 de gösterilmiştir (53).

Tablo 2.1: AAA hastalığının popülasyonlara göre MEFV mutasyon dağılımı (53)

Mutasyonlar	Türkler N=1390	Yahudiler N=1301	Kuzey Afrikalılar N=1049	Araplar N=706	Ermeniler N=378	Askenazi Yahudiler N=87	Iraklılar N=56
<b>M694V %</b>	45	65	71	20	37	16	41
<b>V726A %</b>	11	3	1	14	19	38	21
<b>M680I %</b>	13	1	1	7	21	0	0
<b>M694I %</b>	7	0	0	12	2	0	0
<b>E148Q %</b>	2	5	5	6	3	8	12
<b>Diğer Mutasyonlar %</b>	1	6	3	3	2	14	1
<b>Bilinmeyen Mutasyonlar %</b>	21	20	19	38	16	24	25

## 2.7. Klinik Bulgular

Ailesel Akdeniz Ateşi'nin klinik tablosunu tekrarlayan ateş yüksekliği, peritonit, plörezi ve artrit oluşturur. Klinik bulgular çeşitlilik göstermesine karşın en belirgin olarak karın ağrısı, göğüs ağrısı ve eklem ağrısının birlikte yer aldığı ateşli ataklardır (30). Semptomlar hastaların yaklaşık olarak %50'sinde yaşamın ilk on yılında ortaya çıkar, ancak seyrek de olsa 30 yaşından sonrada semptomlar görülmeye başlayabilir ve

yaklaşık olarak hastaların %90'ında hastalık teşhisi 20 yaşından önce konur (31). Çocuklarda hastalığın başlangıç yaşı 5 dir (32).

Atak süresi oldukça değişkendir, ataklar ani olarak ortaya çıkar ve 12-96 saat sürer ve kendiliğinden kaybolur. Atak sıklığı haftada birden 3-4 ayda bire kadar değişkenlik gösterebilir. Ataklar sırasında hastalar genellikle asemptomatiktir (13,33). Atakların süresi aynı kişide ataklar arasında farklılık gösterebilir (32).

### **2.7.1. Ateş**

Her hastada görülür. Ateş atakla birlikte 38-40<sup>0</sup>C olup 1-3 günde kendiliğinden kaybolur. Hastaların çoğu ateş varlığını fark etmeyebilir. Tekrarlayan ateş çocukluk çağında tek belirti olabilir. Kolşisin kullanan hastalarda ateş belirgin bir artış göstermeyebilir (11).

### **2.7.2. Karın ağrısı**

Karın ağrısı hastaların %90'ında görülen yaygın bir semptomdur. Genellikle ateşten önce görülür. Aniden ortaya çıkar ve bütün batına yayılan bir ağrı şeklindedir. Ağrı şiddeti değişkenlik gösterebilir. Ağrı normale döndükten sonra 1-2 gün süreyle devam eder. Yetişkinlerde kabızlık görülürken çocuklarda diyare daha yaygın olarak görülür (11,31).

### **2.7.3. Plörezi**

Hastaların yaklaşık %45'inde meydana gelir. 7 gün kadar devam edebilir. Hastaların %5'inde belirleyici semptom olabilir. Tek başına yada abdominal ataklarla birlikte görülebilir (14,16).

#### **2.7.4. Perikardit**

Genellikle hastalığın ileri evrelerinde görülür. AAA hastalarının %0.5'inde meydana gelir. Akut atakları takip eden konstriktif perikardit vakalar bildirilmiştir (16).

#### **2.7.5. Artrit**

Hastaların yaklaşık %25-41'inde görülmüştür. Üç formu belirtilmiştir. Bunlardan birincisi, asimetrik zararsız artritdir. Sıklıkla diz, el ve ayak bileği gibi bir yada iki eklem bölgesinde gözlenir. İkincisi, kronik zararlı artritdir. Sıklıkla kalça kemiği ve dizlerde etkisini gösterir. Tekrarlayan ataklarda sürekli zarar verir. Kalça kemiği artritini az rastlanır (%0.4). Üçüncü olarak da göçmen poliartrit, benzeş akut rumatik ateştir (16).

#### **2.7.6. Miyalji**

Miyalji atakları genellikle kollar ve bacaklarda olur. Üç haftadan fazla sürebilir. AAA'da klinik betimlemesi tam olarak anlaşılammıştır. Ağrı şiddeti, ateş derecesi ve süresi değişkenlik gösterir.

#### **2.7.7. Cilt bulguları**

Hastaların yaklaşık %3-46'sında görülür. Diz ve ayak bileği arasında ki bölgede yerleşiktir. Erizipel benzeri kızarıklık gözlenir. Semptomlar sıklıkla 24-48 saat sürer. AAA hastalığı için oldukça tipiktir. Genellikle ateş ve artrit eşlik eder (13).

### **2.7.8 Splenomegali**

AAA hastalarının %30'unda görülmüştür (16).

### **2.7.9. Vaskülit**

AAA hastalığı sırasında vaskülitlere rastlanır. AAA'da en sık görülen vaskülit Henoch-Schönlein purpurası (HSP) ve Poliarteritis Nodosa (PAN) dir (13).

### **2.7.10. Amiloidoz**

AAA'nın en ciddi ve ölümcül komplikasyonu nefropatik amiloid A (AA) tip amiloidozistir. ve tedavi edilmeyen hastaların çoğu (%90) 40 yaşına kadar amiloidoz geliştirir (34). Amiloidoz erkeklerde daha sık ortaya çıkmaktadır (14). AAA 'da amiloidoz böbrek dışında tiroid bezlerinde, karaciğerde dalakta, gastrointestinal sistemde ve nadiren de kalp de gelişir (36).

Kolşisin tedavisinin uygulanmadığı yıllarda yetişkin AAA hastalarında amiloidoz görülme oranı %60 olarak bulunmuştur. Düzenli kolşisin kullanıldığında amiloidoz gelişimi büyük oranda önlenmektedir (35).

Etnik köken, kalıtım ve çevre faktörleri amiloidoz gelişimini etkiler. Türk AAA'lı hastalarda amiloidoz gelişimi %7-13 oranında olduğu gösterilmiştir (37). Amiloidoz, Iraklılar, Askenazi Yahudileri ve Araplarda daha az sıklıkla görülmektedir (6). Amiloidoz gelişimi açısından aile öyküsünde amiloidoz öyküsü olan kişiler, olmayanlara göre 6 kat daha fazla amiloidoz geliştirme riskine sahip olduğu gösterilmiştir (37).



## **2.8. Laboratuvar Bulguları**

AAA hastalığı için DNA mutasyon analizi hariç kesin tanı koydurucu bir laboratuvar testi yoktur. Ataklar sırasında sık rastlanılan CRP, Serum amiloid A, fibrinojen, haptoglobulin ve C3 C4 gibi akut faz reaktanlarında artışlar olmaktadır. Bu bulgular ataklar arası dönemlerde sabit durumdadırlar. Serum amiloid A (SAA) subklinik inflamasyonu belirlemede en iyi belirteç olduğu gösterilmiştir (32,38).

Sitokinler akut faz reaktanlarının oluşu sırasında esas mediatörlerdir (38). IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  atak sırasında yüksek bulunurken, IL-6 ataklar arasında kontrol grubundan yüksek olduğu ve bunun devam eden subklinik inflamasyonun işareti olabileceği düşünülmüştür (39). IL-6, karaciğerden akut faz reaktanlarının sentezini indükler. TNF- $\alpha$ , akut inflamasyonda T-helper hücrelerin aktivasyonunu artırır. IL-8 ise akut inflamasyon bölgesine lökositleri çekebilme özelliğine sahiptir (38). AAA haslarında akut inflamasyonun olmadığı dönemlerde IL-1, IL-6 ve IL-8 düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum hastalarda asemptomatik dönemde de subklinik inflamasyonun sürdüğünü gösterebilir (40).

## **2.9. Tel-Hashomer Tanı Kriterleri**

AAA hastalığının tanısında 1997 yılından itibaren Tel-Hashomer kriterleri kullanılmakta ve kesin tanı için iki majör veya bir majör, iki minör kriter; muhtemel tanı için ise bir majör ve bir minör kriter seçicidir (Tablo 2.2) (29).

Tablo 2.2: Livneh ve ark. tarafından AAA tanısına yönelik Tel-Hashomer tanı kriterleri (29)

<b>Major Kriterler</b>
1 Peritonit, sinovit veya plörit ile giden tekrarlayıcı ateşli ataklar
2 AA tipi amiloidoz
3 Kolşisine cevap
<b>Minör kriterler</b>
1 Tekrarlayıcı ateş atakları
2 Erizipel benzeri eritem
3 Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü

## 2.10. Tedavi

AAA hastalığının tedavisinde kullanılan tek etkili ilaç kolşisindir. Kolşisin 1972 yılında Goldfinger tarafından AAA tedavisinde faydalı olduğu gösterilmesinden itibaren tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Antiinflamatuvar etkisi nedeniyle eski çağlardan bu yana kullanılmıştır. Kolşisin zambak ailesinin bir üyesi olan *Colchicum autumnale* adlı bitkiden elde edilen alkaloiddir (31).

Günlük kolşisin kullanımı atak sıklığını ve şiddetini belirgin düzeyde indirmekte ve amiloidoz gelişimini büyük oranda önlemektedir (41). AAA'yı diğer otoinflamatuvar hastalıklardan ayıran en önemli özellik, atakların kolşisin kullanımına olumlu yanıt vermesidir. Bu durum önemli bir tanı ögesi olarak yer almaktadır. Günlük kolşisin kullanımı, ataklar arasında kullanıma göre daha etkindir (42). Uzun süreli kolşisin kullanımı endotel hücrelerin gen ifadelerinin değiştirdiğinden dolayı, sadece ataklar sırasında kolşisin kullanımı ani bir tedavi etkisi yaratmayacağı anlaşılmıştır (43).

AAA'lı hastaların periton ve diğer serozal sıvılarında C5a inhibitör azlığı saptanmıştır. Nötrofiller C5a salınan bölgeye kemotaktik olarak ilerlerler. Bu etki C5a tarafından düzenlenir. AAA'da kontrolsüz inflamasyondan C5a inhibitör eksikliği sorumlu tutulmuştur. Kolşisin inflamasyonun başlangıcında ki C5a salınımını önlediği düşünülmektedir (32).

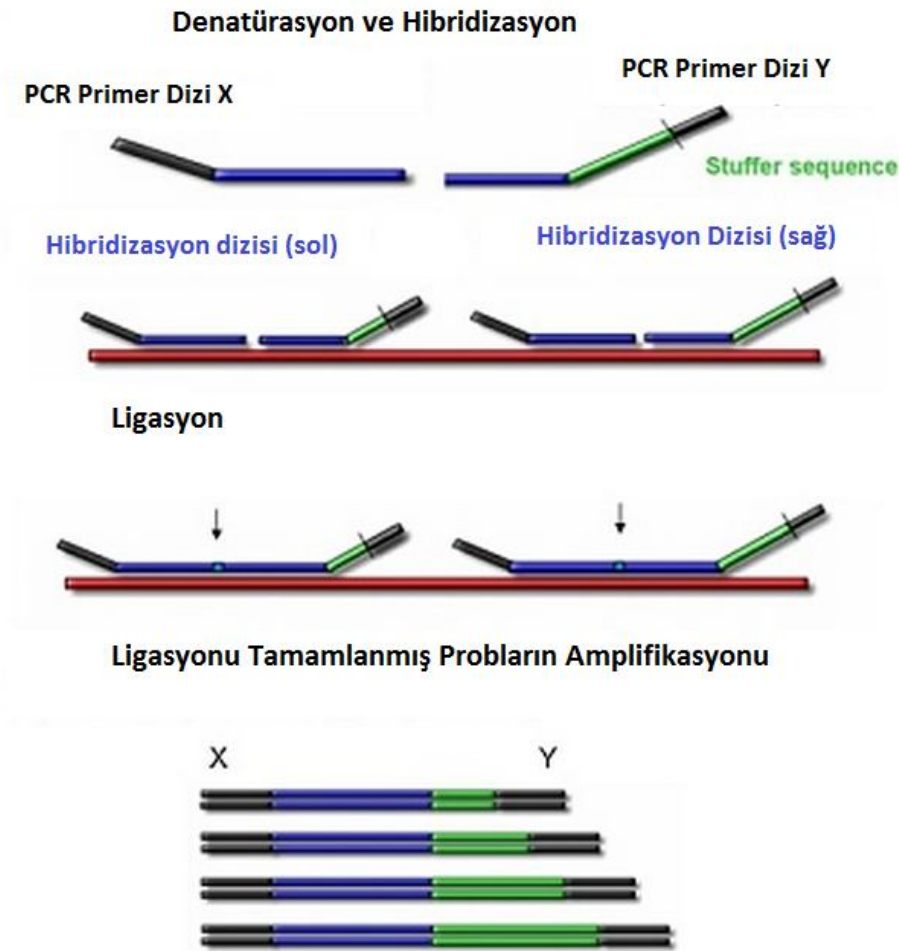
AAA hastalarının yaklaşık olarak üçte birinde, kolşisine yanıt alınmadığından farklı çözüm yöntemleri bulmak için araştırmalar devam etmektedir. Ruhsal durumların atakların tetiklenmesine yol açmasından başlayarak, kolşisine dirençli hastalarda SSRI (serotonin geri emilim blokerleri) kullanımı önerilmiştir (44).

## **2.11. MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)**

MLPA; 50 farklı genomik DNA yada RNA dizisinin anormal kopya sayısı değişikliklerinin değerlendirilebildiği bir multipleks PCR metodudur (67). İlk defa 2002 yılında Schouten ve ark. tarafından tanımlanmış bir metottür. Bu yöntem ile duplikasyonlar, ekzon delesyonları, trizomiler, tümör örneklerinde ki kromozomal düzensizliklerin karakterize edilmesi ve SNP (tek nükleotid polimorfizmleri) tespiti yapılabilir (68). MLPA tekniği uygulaması kolay ve PCR ve kapiller elektroforez cihazının olduğu her laboratuarda uygulanabilir. 96 örneğe kadar aynı anda çalışılabilirlik sunmakta ve 24 saat içinde sonuç alınabilmektedir. MLPA reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olabilmektedir. MLPA reaksiyonunda hedef dizi değil hedef diziye hibridize olan MLPA problemleri amplifiye olur ve standart multipleks PCR'dan farklı olarak bir çift primer kullanılır. Elde edilen amplifikasyon ürünleri 130-480 nükleotid uzunluğundadır ve kapiller elektroforez cihazında analiz edilebilir. Kapiller elektroforez cihazından elde edilen piklerin referans örnekler ile karşılaştırılması ile anormal kopya sayısı değişiklikleri tespit edilebilir (67).

Her bir hedef dizi bölgesi için 2 MLPA probu bulunur ve her MLPA probu birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid dizisi içermektedir. Her prob 5' ve 3' olmak

üzere 2 oligonükleotid içerir. Her oligonükleotid de hedef diziyeye özgü dizi ve tüm problemlerin eş zamanlı multipleks PCR amplifikasyonununun gerçekleşebilmesi için evrensel primer dizileri içerir. Toplam prob uzunluğunun ayarlanması için bir yada genellikle iki oligonükleotidde de dolgu (stuffer) dizisi bulunur. Dolgu (stuffer) dizisi her probta farklı uzunlukta yer alarak problemlerin uzunluklarınının değişken olmalarını sağlar. 3' oligonükleotid 5' ucundan fosforlanmıştır ve böylece 5' oligonükleotid ile hibridize olabilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: MLPA hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamaları (67)

MLPA problemlerinin 5' oligonükleotid parçasının 5' ucunda 19 nükleotid uzunluğunda üniversal primer dizisi ve 3' ucunda ise 21-30 nükleotid uzunluğunda hedefe özgü dizi bulunur. Probun 3' oligonükleotid parçasının 3' ucunda 23 nükleotid

uzunluğunda üniversal primer dizisi ve 5' ucunda ise 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk prob oligonükleotid parçasına komşu şekilde hedef diziye hibridize olacak diziye sahiptir. 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan üniversal dizi ve 19-370 nükleotid arasında değişen dolgu dizisi bulunmaktadır (69). MLPA yönteminde problemler arasındaki uzunluk farkları dolgu dizileri ile sağlanır. 3' oligonükleotid parçasının uzunluğu 440 nükleotide kadar çıkabilir. Fakat şu ana kadar 100 nükleotide kadar olan oligonükleotidler kimyasal olarak sentezlenebilmekte ve daha uzun olan oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından dolayı kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bundan dolayı bu oligonükleotidlerin sentezlenebilmesi tek iplikçikli DNA fajları klonlama vektörleri olan M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmi olarak çift zincirli hale getirilmiştir. Probmikslerin çoğunluğu 35-42 prob içermektedir ve problemlerin ardışık amplifikasyon ürünleri genellikle 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde üretilmektedir. Farklı her MLPA probmiksi için, her prob M13 vektöründe elde edilir. Bu problemler farklı dolgu dizileri ve hibridizasyon dizileri içermektedir. Farklı problemlerin amplifikasyon ürünleri heterodupleks formasyonu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 tane farklı M13 vektöründen elde edilen MLPA probu hazırlanmış ve her biri farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içermektedir. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotidler, gerekli uzunluğu sağlayacak şekilde bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren amplifikasyon ürünü 94-124 baz çifti uzunluğunda olan problemler başarılı şekilde kullanılmaktadır. M13 vektöründen elde edilen oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları birçok amplifikasyon ürünlerinin amplifikasyon özelliklerinin bilinmesini sağlamaktadır. Mutasyon saptamada ve tek nükleotid polimorfizmlerinin saptanmasında hibridize olan hedefe özgü spesifik diziler hedef diziye yarışmalı olarak bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamaktadır (68).

MLPA yöntemi geniş spektrumlu birçok hastalık grubunu ilgilendiren delesyonlar, duplikasyonlar gibi genomik yeniden düzenlenmeler gibi yada nokta mutasyonların araştırılmasında kullanılabilir (68).

### 2.11.1. SALSA MLPA P094 (lot 1206) MEFV Prob Kiti

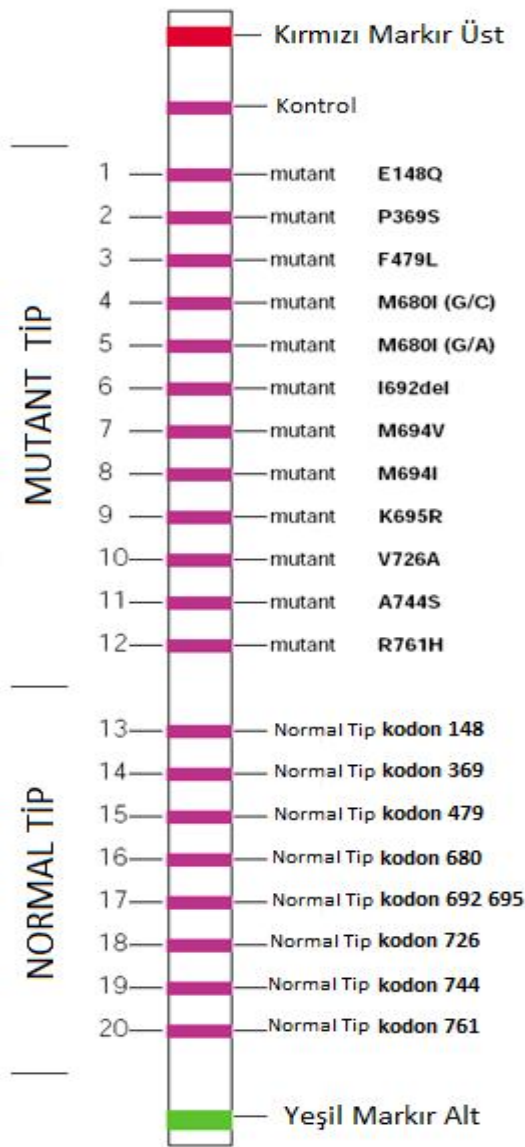
P094 MEFV prob kiti uzunlukları 136 ve 319 nt arasında değişen yirmi iki adet prob içerir. Buna ek olarak 120 nt den küçük 5 adet kontrol fragmenti içerir. Bu kontrol fragmentlerinden 4'ü (Q-fragments) miktar fragmentleridir. Biri ise 92 nt uzunluğunda ligasyon bağlı kontrol fragmentidir. 22 MLPA probu içinde MEFV geninin 10 ekzonu için 13 prob ve farklı kromozomlara lokalize genlerden referans olarak da 9 prob içermektedir (Tablo 2.3) (67).

Tablo 2.3: MLPA P094 Probmiks (67)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position reference	MEFV
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
92	Ligation dependent control fragment at 2q14		
135	Reference probe 0662-L0158	2q14	
143	<b>MEFV probe</b> 5443-L4880		<b>Promotor</b>
148	<b>MEFV probe</b> 5450-L5460	6p21	<b>Exon 4</b>
154	Reference probe 3526-L2892		
160	<b>MEFV probe</b> 5444-L4881		<b>Exon 1</b>
166	<b>MEFV probe</b> 5451-L4888	7q36	<b>Exon 5</b>
175	Reference probe 3780-L3289		
184	<b>MEFV probe</b> 5445-L4882		<b>promotor</b>
193	<b>MEFV probe</b> 5452-L4889	17q11	<b>Exon 6</b>
	18 nt gap		
211	Reference probe 3567-L2933		
220	<b>MEFV probe</b> 5453-L4890		<b>Exon 7</b>
229	Reference probe 2264-L1750	3p21	
238	<b>MEFV probe</b> 5447-L4884		<b>Exon 2</b>
247	<b>MEFV probe</b> 5454-L4891	3p25	<b>Exon 8</b>
256	Reference probe 3682-L3586		
265	<b>MEFV probe</b> 5448-L4885		<b>Exon 2</b>
274	<b>MEFV probe</b> 5455-L4892	14q22	<b>Exon 9</b>
283	Reference probe 2338-L1822		
292	<b>MEFV probe</b> 5449-L4886		<b>Exon 3</b>
301	<b>MEFV probe</b> 5456-L4893	12q23	<b>Exon 10</b>
310	Reference probe 3011-L2451		
319	Reference probe 2525-L1956		

## 2.11.2. AAA'da Strip Assay uygulaması ve MLPA yöntemi ile farklılıkları

Strip Assay uygulaması temelde ters hibridizasyona dayalı bir uygulamadır. Ters hibridizasyon yöntemi hedeflenen genlerin biotin ile işaretlenmiş primerlerin çoklu polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında stripler (nitroselüloz zar) üzerinde ki oligonükleotid problemlerle hibridizasyon ve konjugat-substrat enzimatik reaksiyonunun gerçekleşmesi ile striplerde ki renk değişimlerinin incelenmesi esasına dayanır (78).



Şekil 2.8: AAA Strip üzerinde ki kontroller, mutant tip ve normal tipe ait renkli hibridizasyon çizgileri (77)

AAA tanısı için kullanılan rutin testler arasında 1. Sıradadır. Test stribi eş zamanlı olarak Şekil 2.8 de görüldüğü gibi AAA için fenotiple ilişkili en sık rastlanılan 12 mutasyonun (M694V, M680I(G/C), V726A, E148Q, P369S, F479L, M680I(G/A), I692del, M694I, K695R, A744S ve R761H) teşhis edilmesine olanak sağlar. Yöntem 4 aşamadan oluşur. Bunlar; Kan veya doku örneklerinden genomik DNA'nın izolasyonu, in vitro biotin ile işaretlenmiş primerler kullanılarak çoklu polimeraz zincir reaksiyonu, test stribinde çoğaltılan ürünlerin hibridizasyonu (Şekil X de 2 renkli markır, 1 kontrol, 8 normal tip ve 12 mutant tip oligonükleotid proplar) ve son olarak renkli substrat alkalın fosfataz ile biotin bağılı dizilerin enzimatik olarak renk değişimi sonrası teşhisidir. İnkübatör ile aynı anda 30 hastanın mutasyon tesbiti yapılabilir (78).

Homozigot normal bireyde alellere ait sinyaller mutant tip sinyalin olmadığı durumda renk değiştirerek görünür hale geçer. Heterozigot durumda 1 normal, 1 de mutant prob ilgili mutasyon için görünür durumdadır. Bileşik heterozigot olduğunda normal alel kaybolur ve ilgili iki mutasyon stribde görünür duruma geçer (78).

AAA Strip Assay analitik duyarlılığı Delgue ve ark. tarafından altın standart DNA dizi analizine göre %97 olarak bulunmuştur (79). 6 saatte sonuç verebilen bir yöntemdir. Çok az miktarda DNA ile (50ng) kapsamlı mutasyon analizi yapılabilir. Test stribinin genişletilebilir olması eklenecek başka mutasyonlarla birlikte güncellenebilir durumdadır. AAA Strip Assay, hızlı kolay uygulanabilir ve güvenilirlik açısından AAA tanısında ilk sırada yer almaktadır (80).

MLPA yöntemi uygulama açısından benzer kolaylıklara sahiptir. MLPA yönteminde tek primer çifti kullanılarak çoklu polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilir ve hedef diziye hibridize olan proplar çoğaltılarak kapiller elektroforezde fragment analizi gerçekleştirilir (67). MLPA yönteminde Strip Assay ile teşhis edilen mutasyonların dışında delesyon, duplikasyon gibi genomik yeniden düzenlenmeler geninin tüm ekzon ve promotöründe tüm değişimleri belirleyebilen bir yöntemdir (68). MLPA yönteminde tek nükleotid polimorfizmi yada nokta mutasyonu ilgili gen bölgesinde probun hibridize olduğu ligasyon bölgesine denk gelebilir ve delesyon olarak görülebilir bu nedenle MLPA yöntemi verimli bir tarama yöntemidir ve bulunan değişimlerin DNA dizi analizi ile kontrol edilmelidir (67).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Materyal Seçimi**

Araştırmada 2006-2010 yılları arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına Tel-Hashomer tanı kriterlerine göre klinik olarak Ailesel Akdeniz Ateşi tanısı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bölümünden gönderilmiş ve strip assay yöntemi ile herhangi bir mutasyon saptanamamış 26 olgu kullanılmıştır. Çalışmanın güvenilir olarak gerçekleşmesi için kontrol grubu olarak sağlıklı 6 birey çalışmaya dahil edilmiştir. MLPA yöntemi MEFV geni ekzonları ve promoter bölgesi için bulunabilecek genomik değişimler açısından incelenmiştir.

#### **3.2. Kullanılan Gereçler**

Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Spektrofotometre (Nano Drop 1000)

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI 3130)

ABI 3130 36 cm Kapiller (ABI)

Mikosantrifüj (Sigma)

PCR Aleti ( Thermal cycler GenAmp PRC System 9700 ABI PRISM)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin Dondurucu (Arçelik)

Vorteks ( Heidolph)

Pipet Takımı (Gilson)

Ependorf Tüpü 1.5ml (Eppendorf)

ABI 3130 yükleme tüpleri (ABI)

0.2 ml PCR tüpü

### **3.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact nucleic Acid Isolaiton Kit I)

Salsa MLPA MEFV Kiti (Salsa P094 MRC-Holland)

10X EDTA'lı Buffer (ABI)

Performans Optime Edici Polimer 4 (POP4 TM ABI)

Hİ-Dİ Formamide (ABI)

Gene Scan 500 Rox İnternal Size Standart (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

Distile Su

### **3.4. Magna Pure Compact Ekstraksiyon Robotu İle DNA Eldesi**

Kan örneklerinden DNA izolasyonu direkt olarak kartuş sistemi aracılığıyla işlev gören robotik sistem kullanılarak elde edilmiştir. Kartuş sistemi içerisinde parçalama (lysis), yıkama (washing) ve elüsyon (elution) aşamalarını gerçekleştiren solüsyonlar yer almaktadır. DNA izolasyon protokolü olarak ‘DNA isolation blood’ ve 200 µl kan örneği 100µl DNA protokolü seçilmiştir. İşlem yaklaşık olarak 25 dakika sürmektedir. Elde edilen DNA örnekleri -20<sup>0</sup>C de saklanmaktadır.

### **3.5. Elde edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemi İle İzolasyonu**

#### **3.5.1. Denatürasyon ve hibridizasyon**

- İzole edilen DNA örneklerinden 5µl DNA (20-250ng) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Thermal cycler cihazında DNA örneklerinin 98<sup>0</sup>C de 5 dakika denatürasyonu sağlandı.
- Örnekler thermal cycler cihazı üzerinde 25<sup>0</sup>C'ye soğutularak beklemeğe alındı.
- 25<sup>0</sup>C de bulunan DNA örneklerinin üzerine 1.5 µl SALSA MLPA P094 probemiks ve 1.5µl SALSA MLPA tampon (buffer) eklenerek homojenize edildi.
- Buharlaşmayı önlemek için strip tüplerinin üzerine 5µl Mineral yağ eklendi.
- 95<sup>0</sup>C de 1 dakika inkübasyon gerçekleştirildi ve 60<sup>0</sup>C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

#### **3.5.2. Ligasyon reaksiyonu**

- Hibridizasyon reaksiyonu tamamlandığında thermal cycler cihazının sıcaklığı 54<sup>0</sup>C'ye indirildi.
- Örnekler 54<sup>0</sup>C de indirildikten sonra strip tüpleri içerisinden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alındı.
- 54<sup>0</sup>C deki örneklerin üzerine 32 µl ligasyon miks ( 3µl Ligase-65 buffer A, 3µl Ligase-65 buffer B, 25µl distile su, 1µl Ligase-65) eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.
- Örnekler 54<sup>0</sup>C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

- Daha sonra örnekler 98<sup>0</sup>C de 5 dakika bekletilerek ligaz enziminin inaktivasyonu sağlandı.
- Örnekler Thermal cycler cihazı üzerinde 4<sup>0</sup>C de beklemeye alındı.

### 3.5.3. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu)

- Yeni PCR strip tüplerine 26 µl distile su ve 4 µl SALSA PRC tampon (buffer) aktarıldı. Ligasyon reaksiyonu ürünlerinden 10 µl alınarak oda ısısında bu yeni tüplerin üzerine aktarıldı. Dikkatlice pipetaj yapılarak homojenize edildi.
- Örnekler Thermal cycler üzerinde 60<sup>0</sup>C'ye getirilerek beklemeye alındı.
- Polimeraz miks (2 µl SALSA PCR Pimer, 2 µl SALSA enzim dilüsyon tamponu, 5.5 µl distile su, 0.5 µl SALSA polimeraz) hazırlandı ve 60<sup>0</sup>C de bekleyen örneklerin üzerine eklenerek PCR başlatıldı.
- PCR şartları;

#### a) Amplifikasyon (38 döngü)

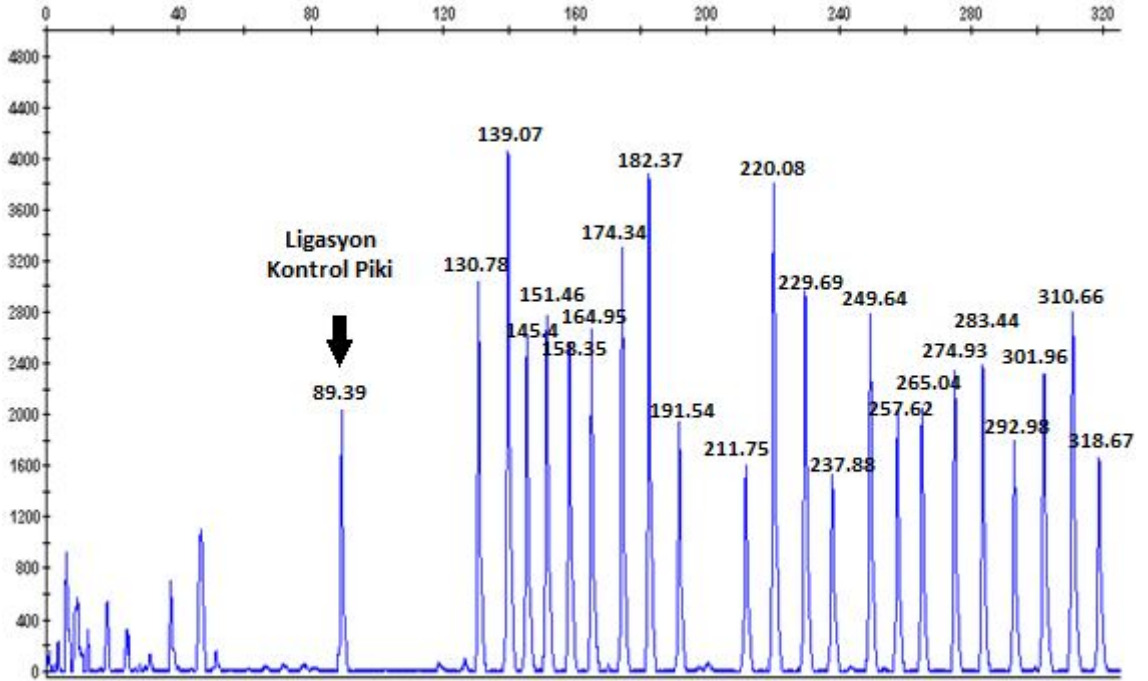
- 1) Denatürasyon 30 sn 95<sup>0</sup>C
- 2) Eşleşme (Anneling) 30 sn 60<sup>0</sup>C
- 3) Uzama (Ekstansiyon) 60 sn 72<sup>0</sup>C

#### b) Son Ekstansiyon 20 dk 72<sup>0</sup>C

### 3.5.4. ABI 3130 Genetic Analyser cihazına yükleme

- PCR bitiminde örneklerden 1 µl alınarak ABI 3130 cihaza yükleme tüplerine aktarıldı.

- Daha sonra tüplere 0.5µl internal size standart (Rox 500) ve 8.5 µl deiyonize formamid konularak dikkatlice pipetaj yapılarak hemojenize edildi.
- Örnekler 94<sup>0</sup>C de 5 dakika tutularak denatürasyon gerçekleştirildi.
- Sonra örnekler buz üzerine alındı.
- ABI 3130 cihazında; 15kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60<sup>0</sup>C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı filtre C şartları sağlandı.
- Örnekler ABI 3130 cihazına yüklenerek, Gene Mapper 4.0 programında okutuldu.
- Örneklere ait pik alanları ve pik görüntüleri elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: MLPA pik görüntüleri. X ekseninde floresan sinyal değeri, ortalama olarak en kısa prob en uzun probun 1/3 kadar uzunluğa sahip olmalıdır. Y ekseninde prob uzunluklarını (nt olarak) göstermektedir.

### 3.5.5. Değerlendirme

MLPA çalışmasının değerlendirme basamağında, okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları GeneMapper versiyon 4.0 programı ile değerlendirildikten sonra excel dosyası formatında kaydedildi. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldı. Normal örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Coffalyser programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, internal kontrol piklerinin ( Tablo 2.3 de gösterilen referans proplar) her bir pik alanının o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesi ile birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranları pik alanları normal karyotipe sahip olduğu bilinen ve test örneklerle aynı testte çalışılmış 3 örneğin kanlarından elde edilen eksternal kontrol pikleri pik alanlarının ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.

Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 3 eksternal kontrol örnekleri kullanıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Coffalyser programı otomatik olarak internal kontrol ve eksternal kontrol pik değerleri ile aşağıda ki formülü kullanarak her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır.

$$\text{Doz Oranı} = \frac{\text{Hasta T. P. A. D.}}{\text{Hasta P. A. T. D. (İ.P.A.)}} = \frac{1. \text{ Kontrol T. P. A. D.} + 2. \text{ Kontrol T. P. A. D.} + 3. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{1. \text{ Kontrol P. A. T. D.} + 2. \text{ Kontrol P. A. T. D.} + 3. \text{ Kontrol P. A. T. D. (E.P.A.)}}$$

3

T. P. A.D.: Test Piki Alan Değeri  
P. A. T.D.: Pik Alanları Toplam Değeri  
İ. P. A.: İnternal Pik Alanları  
E. P. A.: Eksternal Pik Alanları

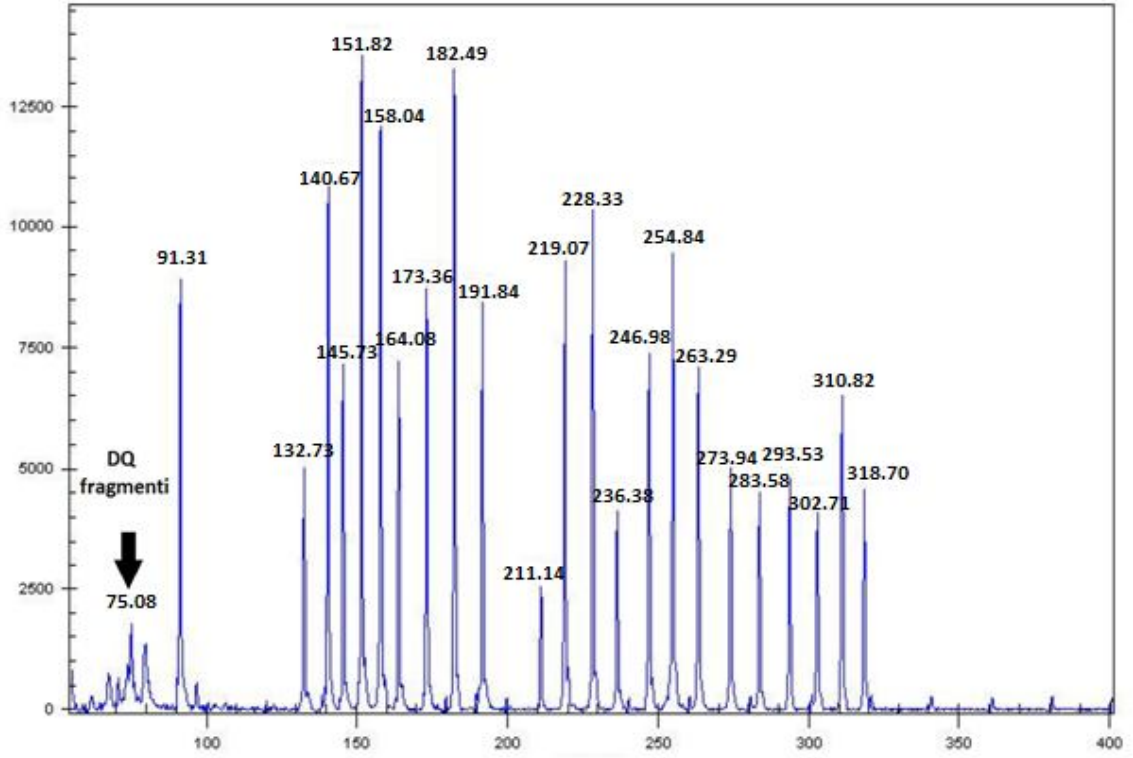
Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, 0.7 değerinden küçük değerlerde ise doz eksikliği yani delesyon olduğu ve 1.3 değerinden fazla değerlerde ise doz fazlası yani amplifikasyon olduğu belirlenmektedir.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genetik Anabilim Dalı'na 2006-2010 yılları arasında Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bölümünden gönderilmiş 26 olgu ve sağlıklı olduğu bilinen 6 bireyin kan örnekleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. AAA tanısı almış olgular ve kontrol grubu AAA'dan sorumlu gen olan MEFV geninde ki değişimler MRC Holland P094 MEFV probmiksi kullanılarak MLPA yöntemi ile incelenmiştir.

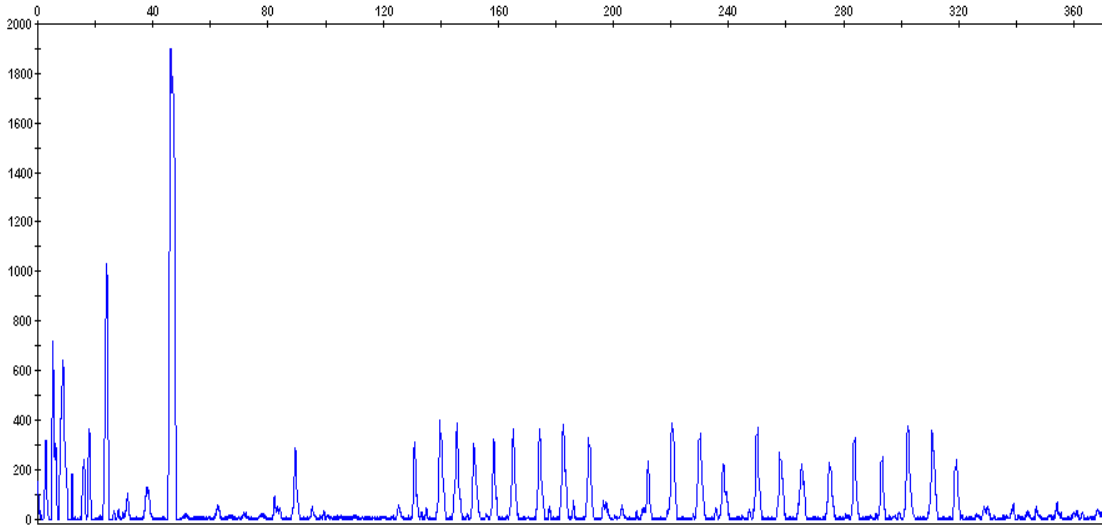
Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri, Salsa MLPA kiti ile amplifikasyonundan sonra ABI 3130 kapiller elektroforez cihazında yürütülüp GeneMapper versiyon 4.0 programı ile analizi gerçekleştirildi. Kapiller elektroforezde farklı uzunlukta fragmentler oluşarak her fragment uzunluğuna göre belli sırayla analizi gerçekleştirilmektedir. GeneMapper programında pik alanları ve prob uzunlukları elde edildi ve excel dosyasında spesifik olmayan pik alanları silinerek kaydedildi. Excel tabanlı olarak çalışan Coffalyser versiyon 9 programına aktarıldı.



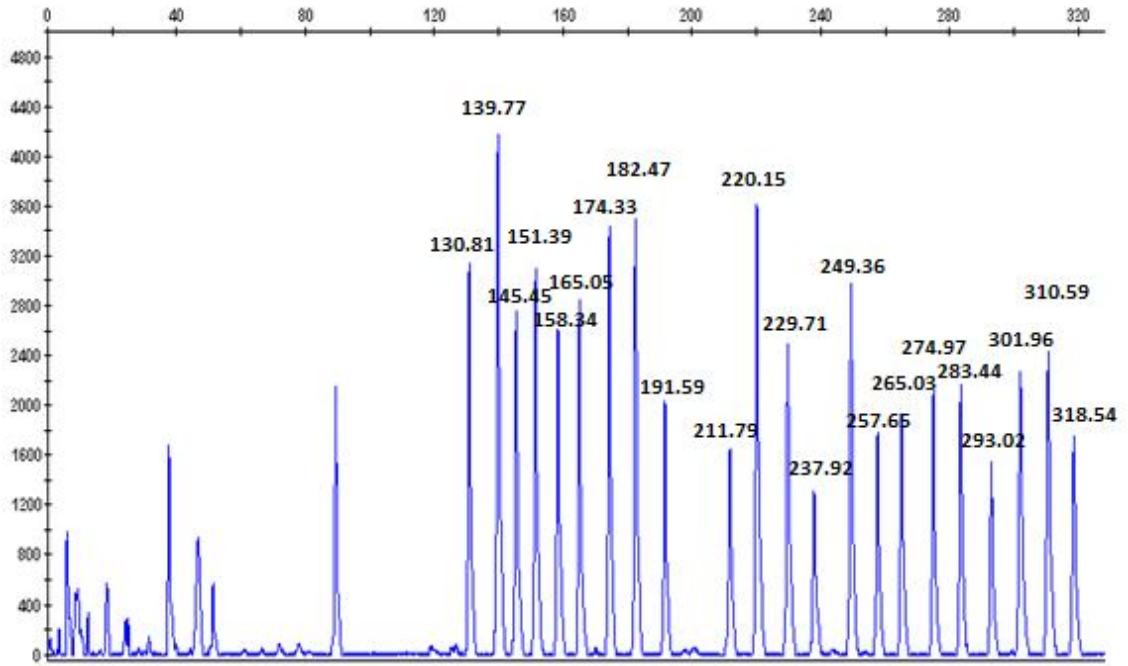


Şekil 4.1: Normal örnekte yaklaşık 50 ng DNA ile gerçekleştirilmiş MLPA reaksiyonunun pik görüntüsü

MLPA analizinde DNA kalitesi DQ= DNA Quantity pikleri ile değerlendirilir. Çalışmamızda kullandığımız P094 prob kitinin, DQ fragmentleri 64-70-76 ve 82 baz çifti uzunluğundadır ve ligasyon gerçekleşmese bile görülebilen piklerdir. DNA miktarının yeterli olup olmadığının tayininde Şekil 4.2 de gösterildiği gibi bu DQ piklerinin yükseklikleri prob piklerinin yüksekliklerinden fazla ise DNA miktarının yeterli olmadığına, Şekil 4.1 de gösterildiği gibi eğer DQ piklerinin yükseklikleri prob piklerinin yüksekliklerinden düşük yada görülemeyecek kadar düşük ise DNA miktarının yeterli olduğuna işaret eder. DQ fragmentleri 100 ng ve altı DNA miktarı kullanıldığında görülebilecek durumdadır.



Şekil 4.2: Kaliteli DNA elde edemediğimiz örneğe ait düşük pik görüntüleri



Şekil 4.3: Eksternal kontrole ait MLPA Salsa P094 prob pik görüntüleri ve prob uzunlukları (size, nt olarak)

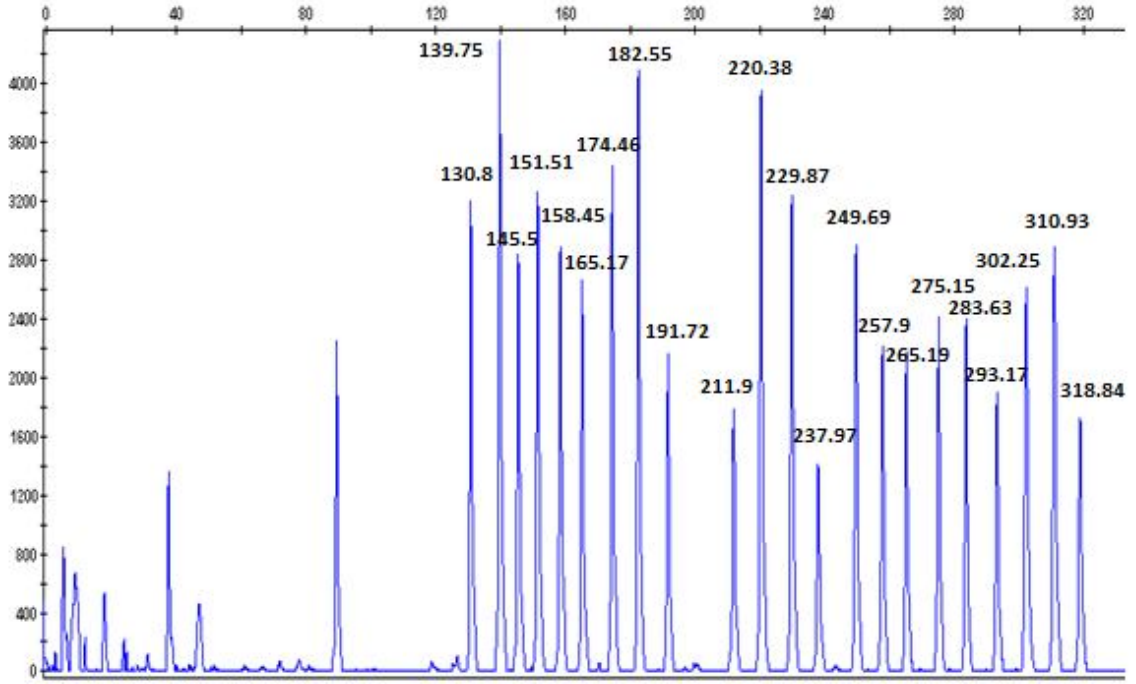
Tablo 4.1: Eksternal kontrole ait pik alanları

	Size	Area		Size	Area
Referans prob	130.81	41709	Referans prob	229.71	37472
MEFV prob	139.77	57089	MEFV prob	237.92	19686
MEFV prob	145.45	36962	MEFV prob	249.36	41994
Referans prob	151.39	42939	Referans prob	257.65	26901
MEFV prob	158.34	36883	MEFV prob	265.03	30004
MEFV prob	165.05	38151	MEFV prob	274.97	31680
Referans prob	174.33	46010	Referans prob	283.44	32354
MEFV prob	182.47	49318	MEFV prob	293.02	23607
MEFV prob	191.59	28195	MEFV prob	301.96	34402
Referans prob	211.79	23720	Referans prob	310.59	37632
MEFV prob	220.15	51636	Referans prob	318.54	26166

#### 4.1. MEFV Geninde Saptanan Bulgular

Hasta grubu ve kontrol grubu için hibridizasyon, ligasyon ve PCR aşamaları gerçekleştirildikten sonra kapiller elektroforezde elde edilen veriler aynı şartlarda ve eş zamanlı olarak çalışılan gruplar için birlikte analizi gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının pik alanları Genemapper programında görsel olarak değerlendirildikten sonra Coffalyser versiyon 9 programına aktarılarak mutasyonlar ve polimorfizmler için değerlendirilmiştir. Coffalyser programında kontrol pikleri ve hasta pikleri karşılaştırılarak ortalama bir değer elde edilir. Elde edilen bu değer 0,7'nin altında ise delesyon yönünde 1.3'ün üstünde ise duplikasyon yönünde değerlendirilir. Coffalyser versiyon 9 programının analiz sonucuna göre çalışılan tüm olgular için 0.7-1.3 oranları arasında değerler elde edilmiştir.

Şekil 4.4 de normal bireye ait pik görüntüleri ve prob uzunlukları (size) yer almaktadır. Şekil 4.3 de ise Eksternal kontrole ait pikler ve prob uzunlukları (size) görülmektedir. Piklerin altında kalan alanlar excel ile düzenlenmiş ve analiz edilmiştir ve elde edilen fragment dizi tablosu Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 de görülmektedir.



Şekil 4.4: Normal olguya ait pik görüntüleri ve prob uzunlukları (size, nt olarak)

Tablo 4.2: Normal olguya ait pik alanları

	Size	Area		Size	Area
Referans prob	130.8	41822	Referans prob	229.87	44810
MEFV prob	139.75	56246	MEFV prob	237.97	19731
MEFV prob	145.5	37349	MEFV prob	249.69	40244
Referans prob	151.51	43689	Referans prob	257.9	32461
MEFV prob	158.45	39363	MEFV prob	265.19	31398
MEFV prob	165.17	35478	MEFV prob	275.15	34849
Referans prob	174.46	46670	Referans prob	283.63	33686
MEFV prob	182.55	54597	MEFV prob	293.17	27887
MEFV prob	191.72	29088	MEFV prob	302.25	37712
Referans prob	211.9	24652	Referans prob	310.93	42168
MEFV prob	220.38	53979	Referans prob	318.84	25198

Tablo 4.3: Çalışılan olgulara ait coffalyser programında değerlendirilen doz oranları

chr pos.	Length (bp)	MV36	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
16p13.3	143	16-003.2 MEFV Exon 01A	0.96	0.96	0.95	0.99	1.01	1	0.98	1.03
16p13.3	160	16-003.2 MEFV Exon 01B	1.03	1.03	0.98	0.94	1.02	0.96	1.01	0.94
16p13.3	184	16-003.2 MEFV Exon 01C	1.01	1	0.99	0.99	1.06	0.95	1	1.04
16p13.3	238	16-003.2 MEFV Exon 02	0.93	0.98	1.05	1.07	1.14	1.03	1.02	1.04
16p13.3	265	16-003.2 MEFV Exon 02	1.03	0.99	1.01	1.1	1.08	1.03	1.02	1
16p13.3	292	16-003.2 MEFV Exon 03	1.02	1.09	1.02	1.06	1.07	1.06	1.03	0.87
16p13.3	148	16-003.2 MEFV Exon 04	0.96	0.93	0.96	0.92	0.97	0.96	1	1.09
16p13.3	166	16-003.2 MEFV Exon 05	0.91	0.91	0.93	0.92	1.01	0.94	0.95	0.95
16p13.3	193	16-003.2 MEFV Exon 06	1.02	0.96	0.96	1	1.03	0.99	0.98	1.08
16p13.3	220	16-003.2 MEFV Exon 07	0.99	0.96	0.98	0.98	1.06	0.95	0.99	0.95
16p13.3	247	16-003.2 MEFV Exon 08	0.92	0.95	0.96	0.96	0.96	0.92	0.91	0.93
16p13.3	274	16-003.2 MEFV Exon 09	1.02	1.01	1.01	1.03	1.08	0.99	0.99	0.93
16p13.3	301	16-003.2 MEFV Exon 10	1.03	0.97	0.95	1.01	1.01	0.99	0.99	0.82
03p21	211	c	1	1	1.03	1	1	1.02	1.03	1.06
03p25	229	c	1.05	1.07	1	1.03	1.05	1	1.03	1.06
06p21	135	c	0.96	0.99	0.95	0.95	0.99	1	0.99	1
07q36	154	c	1.01	0.99	0.98	0.99	0.96	0.96	0.97	1.1
09q34	310	c	1.02	1.06	1.03	1.02	1.1	1.05	1	0.89
12q23	283	c	0.97	1.05	1	1.05	1.06	1.06	1.02	0.9
14q22	256	c	1.08	1.05	1.03	1.03	1.07	1.03	1.05	1.1
17q11	175	c	0.96	0.98	0.94	0.93	1	0.95	0.96	0.99
17q11	319	c	0.93	0.93	0.92	0.94	0.99	0.94	0.92	0.82

Tablo 4.3: Çalışılan olgulara ait coffalyser programında değerlendirilen doz oranları (devam)

chr pos.	Length (bp)	MV36	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
16p13.3	143	16-003.2 MEFV Exon 01A	0.96	0.99	0.89	0.95	0.86	0.97	1.05	1.02
16p13.3	160	16-003.2 MEFV Exon 01B	0.9	0.92	0.92	0.88	0.96	0.88	0.81	1.02
16p13.3	184	16-003.2 MEFV Exon 01C	0.89	0.94	0.89	0.89	0.88	0.89	0.88	1.04
16p13.3	238	16-003.2 MEFV Exon 02	0.91	0.98	0.92	0.97	0.92	0.93	0.97	0.92
16p13.3	265	16-003.2 MEFV Exon 02	1.1	1.08	1.02	1.11	0.9	0.96	0.96	1.02
16p13.3	292	16-003.2 MEFV Exon 03	1.09	1.06	0.99	1.05	1.09	1.1	1.06	1.03
16p13.3	148	16-003.2 MEFV Exon 04	0.86	0.85	0.89	0.96	0.97	0.94	0.99	1.02
16p13.3	166	16-003.2 MEFV Exon 05	0.85	0.84	0.88	0.82	0.83	0.85	0.8	1
16p13.3	193	16-003.2 MEFV Exon 06	0.9	0.89	0.88	0.91	0.91	0.87	0.83	1.02
16p13.3	220	16-003.2 MEFV Exon 07	0.98	1.01	0.88	0.95	0.98	0.96	0.95	0.91
16p13.3	247	16-003.2 MEFV Exon 08	1.01	1	0.96	0.99	1.01	0.95	0.93	0.99
16p13.3	274	16-003.2 MEFV Exon 09	1.03	1.08	1.06	1.03	1.06	0.99	0.98	1.03
16p13.3	301	16-003.2 MEFV Exon 10	1.08	1.03	1.1	1.02	1.05	0.96	0.99	0.8
03p21	211	c	0.89	0.97	0.87	0.97	0.92	0.95	1	1
03p25	229	c	1	1.03	1	1.08	1.02	1	1	1.04
06p21	135	c	0.97	0.96	0.88	0.86	0.84	0.93	0.99	1.1
07q36	154	c	0.97	0.93	0.89	0.95	0.84	0.89	0.93	1.1
09q34	310	c	1.02	1.05	1.1	1.07	1.18	1.1	1.02	0.99
12q23	283	c	0.86	1.05	1.2	1.07	1.12	1.13	1.05	0.8
14q22	256	c	1.06	1.15	1.05	1.1	1.08	1.02	1.08	0.94
17q11	175	c	0.92	0.81	0.88	0.97	0.99	0.94	0.8	1.14
17q11	319	c	0.96	0.96	0.92	0.91	0.86	0.88	0.97	0.88

Tablo 4.3: Çalışılan olgulara ait coffalyser programında değerlendirilen doz oranları (devam)

chr pos.	Length (bp)	MV36	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
16p13.3	143	16-003.2 MEFV Exon 01A	0.98	0.96	0.97	0.96	1.06	1.02	0.87	1.03	0.95
16p13.3	160	16-003.2 MEFV Exon 01B	0.85	0.91	0.96	0.98	0.84	1.19	0.88	1.06	0.95
16p13.3	184	16-003.2 MEFV Exon 01C	0.88	0.91	0.94	1.07	0.84	1.09	0.93	1.04	0.9
16p13.3	238	16-003.2 MEFV Exon 02	0.94	0.92	0.98	1.02	0.96	1.1	0.97	0.92	0.92
16p13.3	265	16-003.2 MEFV Exon 02	0.97	0.96	0.99	0.93	0.96	1.05	1.03	0.98	0.92
16p13.3	292	16-003.2 MEFV Exon 03	0.97	0.93	1.1	1.05	1.02	0.88	1.06	0.84	0.98
16p13.3	148	16-003.2 MEFV Exon 04	0.88	0.93	0.85	1.05	0.93	1.06	0.85	1.06	0.94
16p13.3	166	16-003.2 MEFV Exon 05	0.81	0.87	0.92	1.03	0.85	1.05	0.91	1.08	0.97
16p13.3	193	16-003.2 MEFV Exon 06	0.85	0.83	0.98	1.08	0.91	1.08	0.98	0.89	0.95
16p13.3	220	16-003.2 MEFV Exon 07	0.95	0.96	0.96	1.01	0.94	0.89	0.99	0.94	0.99
16p13.3	247	16-003.2 MEFV Exon 08	0.96	0.97	1.04	1.01	0.89	0.89	1.07	0.95	0.98
16p13.3	274	16-003.2 MEFV Exon 09	1.06	1.08	0.96	1.03	0.97	0.89	0.88	0.85	1.08
16p13.3	301	16-003.2 MEFV Exon 10	0.97	1.02	0.99	1.06	1.05	0.96	1.02	0.89	1.05
03p21	211	c	0.95	0.99	1	0.88	0.88	0.87	1	0.99	1
03p25	229	c	1	1	1	1.15	1	1	1.01	1.08	0.96
06p21	135	c	0.96	0.85	0.83	0.94	0.87	1.12	0.85	1.1	0.98
07q36	154	c	0.99	0.92	0.96	1	0.96	0.88	0.86	0.95	0.96
09q34	310	c	1.13	0.98	1.12	1.15	1.02	0.86	0.96	0.89	1.02
12q23	283	c	1.06	1.15	1.19	0.97	1.1	0.89	1.13	0.91	1.12
14q22	256	c	1.04	1.02	1.08	1.14	1.06	1.03	1	1	0.98
17q11	175	c	0.8	0.82	0.86	1.01	0.8	1.1	0.89	1.13	1.03
17q11	319	c	0.99	0.87	1.12	0.98	1.1	0.93	1.06	0.85	1.07

Coffalyser programında mavi renkli sütunlar ayrı örneklere aittir ve her satır karşılığında gelen prob oranlarını göstermektedir. Tablo 4.3 de ilk sütunda verilen prob oranları Şekil 4.4 de gösterilen olguya ait olan prob oranlarıdır. Coffalyser programında analiz edilen bütün örnekler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Tablo 4.3 de görüldüğü gibi 0.7-1.3 oranları arasında sonuçlar elde edilmiştir ve bu herhangi bir delesyon ve amplifikasyona sahip olmayan prob bölgelerini işaret etmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi tekrarlayan kısa süreli ateş atakları, eklem, göğüs ağrısı ve eritem benzeri deri lezyonları ile karakterize otozomal resesif kalım gösteren bir hastalıktır. Ailevi Akdeniz Ateşi klinik olarak semptomları çeşitlilik gösterir (1). En ciddi komplikasyonlarından biri özellikle böbrekleri etkileyen amiloidoz (Serum Amiloid A) gelişimidir (38). Akdeniz çevresindeki ırklarda ve etnik gruplarda daha sık görülmektedir. Bunlar Türk, Ermeni, Arap ve Yahudi toplumlarıdır (11).

Ailevi Akdeniz Ateşi gelişiminden sorumlu olan MEFV geni 1997 yılında birbirinden bağımsız olarak Fransız AAA Konsorsiyumu ve Uluslararası AAA Konsorsiyumunun eş zamanlı yaptıkları çalışmalar sonucu 16. Kromozomun kısa kolunda haritalanmıştır (46). Bu gen Pirin/Marenostin adı verilen bir proteini kodlamaktadır (26). AAA hastalığına neden olan MEFV genin bulunmasından sonra hastalığa neden olan mutasyonların özellikle hastalığın en çok görüldüğü etnik gruplar olan Türkler, Ermeniler, Araplar ve Yahudiler üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bulunan mutasyonlar ve bu mutasyonlar ile fenotip arasında ilişkiler aranmıştır (40). MEFV geni üzerinde ki araştırmalar sonucu bulunan mutasyonlar infevers veri tabanında toplanmaktadır (50). İlk bulunan mutasyonlar M694V, V726A ve M680I mutasyonlarıdır (53). Bu mutasyonların bulunmasından sonra 1998 yılında 2. ekzonda E148Q, E167D, T267I mutasyonları, 5. ekzonda F479L mutasyonu ve 10. ekzonda M694del, I692del, T681I, R761H, M694I, K695R ve A744S mutasyonları bulunmuştur (72). 2011 yılı itibari ile infevers veritabanında MEFV geni ile ilişkili 208 gen değişimi bildirilmiştir (50).

Ülkemizde Ailevi Akdeniz Ateşi görülme sıklığı 1/1000, taşıyıcı oranı ise 1:5 olarak hesaplanmıştır (11). Türklerde en çok görülen mutasyonlar M694V (%51), M680I (%14) ve V726A (%8) dir. Hastalığın görülme sıklığı, hafif semptomlara sahip hastaların olduğu düşünüldüğünde daha yüksek olabilir.



MLPA tekniği delesyon, amplifikasyon nokta mutasyonları gibi genomik değişiklikleri belirleyebilmek için son yıllarda kullanılmaya başlanan multipleks PCR metodudur. MLPA yöntemi hibridizasyon, ligasyon, PCR ve kapiller elektroforez aşamalarından oluşur. 50-500 ng arasında insan DNA'sı kullanılması ile MLPA gerçekleştirilebilir.

Çalışmamıza Tel-Hashomer kriterlerine göre Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı almış 26 olgu ve 6 kontrol dahil edilmiştir. MLPA yöntemi ile MEFV geninde genomik değişiklikler incelenmiştir. MLPA probmiks ile genin promoter ve 10 ekzonu incelenmiş ve olguların tamamında herhangi bir gen değişikliğine rastlanılmamıştır.

Van Gijn ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada, MLPA yöntemi ile 216 Ailevi Akdeniz Ateşi semptomları gösteren olgularda delesyon ve duplikasyonları incelemişler ve herhangi bir mutasyon saptayamamışlardır (73).

Marek-Yagel ve arkadaşları 2009 yılında MLPA yöntemi ile 18 AAA'lı hastada yaptıkları çalışmada MEFV geninde kopya sayısı değişikliğine rastlamamışlardır. Aynı araştırma grubu 18 olguda cDNA analizi ile MEFV geninin 3'UTR bölgesinde 2 SNP saptamışlardır. Heterozigot AAA hastalarında, AAA otozomal resesif kalıtım göstermesi nedeniyle mutasyon saptanamayan allelerde muhtemelen modifiye edici diğer genlerin ve çevresel faktörlerin hastalığın subklinik inflamasyonunun ortaya çıkmasında etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca hastalığın ortaya çıkmasında etkili olan bu genlerin tanımlanması genome-wide association çalışmalarının yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir (74).

Booty ve çalışma arkadaşları 2009 yılında 46 olgu üzerinde DNA dizileme, ters transkriptaz PCR yöntemini kullanarak gen ekspresyonu ve western blot yöntemi ile protein çalışmaları sonucu, MEFV gen ürünü pirin proteinin diğer etki edici genler tarafından inflamasyonun modifiye edilerek Ailevi Akdeniz Ateşi fenotipine neden olabileceğini, yeni potansiyel genlerin araştırılması ile hassas lokusların tanımlanması sağlanacağını belirtmişlerdir (75).

Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı, moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasından önce ailesel geçmişe ve ilaca verilen yanıtla göre konmaktaydı. AAA tanısının geç konması amiloidoz gibi ciddi komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. AAA hastalığı diğer TRAPS (tümör-nekröz faktör-TNF reseptörü ilişkili periyodik sendrom), HIDS (Hiperimmünglobulinemi D ile seyreden periyodik ateş sendromu), CAPS (kriyopirin ilişkili periyodik sendromlar) gibi otoinflamatuvar hastalıklarla klinik olarak benzerlik taşıdığından dolayı yanlış tanı konulabilmektedir (76). AAA hastalığının diğer otoinflamatuvar hastalıklara olan benzerliğinden dolayı moleküler tanısı oldukça önemlidir.

Federici ve çalışma arkadaşlarının 2006 yılında DNA dizileme yöntemi ile yaptıkları çalışmada klinik olarak AAA tanısı alan 1941 olgunun %27'si moleküler olarak AAA hastası olarak bulmuşlardır. Genetik teşhis olarak AAA tanısı konulamayan olgularda diğer otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkili olabileceği belirtilmiş ve yapılan çalışmada olguların %6.6'sında TRAPS %2'sinde HIDS, %8.3'ünde ise CAPS ilişkili mutasyonlar bulunmuştur. Ciddi semptomlar gösteren 2 olguda TRAPS ve CAPS mutasyonlarının birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Mutasyon bulunmayan olgularda bilinmeyen bir gendeki mutasyonların yada başka bir otoinflamasyonel bir duruma sahip olabileceği bildirilmiştir. Toplamda AAA tanısı için çalışılan olguların %6.8'inin TRAPS, HIDS ve CAPS gibi diğer otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkisi olduğu moleküler olarak ortaya konmuştur. Otoinflamasyonel hastalıkların klinik teşhisinde bazı tanı kriterleri çakışabildiğinden dolayı klinisyenlerin bunun farkına varmasının oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (64).

Üstek ve çalışma arkadaşları 2008 yılında DNA dizileme yöntemi ile 289 AAA hastasının katıldığı çalışmada MEFV ekspresyonunun regülasyonunda rolü olan 3'UTR dizisinde 2 haplotip oluşturan çok sayıda SNP saptamışlardır. MEFV geninde saptanan rs2741918 vers450021 tek nükleotid polimorfizimleri taşıyan hastalar sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında SNP'leri taşıyan hastalarda heterozigotluk oranının yüksek olduğu da belirtilmiştir. MEFV geninde 2 Alu tekrarı içinde 2 haplotip oluşturan 3'UTR polimorfizimleri ile kodlayan bölgede polimorfizm içermeyen AAA hastaları arasında

ilişki saptanmıştır. MEFV mutasyonu taşımayan hastalarda inflamazom komplekslerinin komponentlerinde ki mutasyonlar yada polimorfizmler henüz tanımlanamadığından dolayı AAA fenotipi ile ilişkili olabilir yada MEFV regülatör polimorfizm veya mutasyonları gen ekspresyonunu değiştirerek mRNA seviyesinde azalmaya neden olabileceğini belirtmişlerdir (62). AAA hastalarının neden MEFV mutasyonu taşımadıklarına dair en mümkün açıklama genetik heterojenite olabilir (58).

AAA fenotipinin ortaya çıkmasında başka genler ile epigenetik modifikasyonlar etkili olabilir. İnflamozomu oluşturan genlerden biri olan ASC geni fenotipin ortaya çıkmasına neden olabilir ASC geni Pirin proteini ve diğer inflamasyonda görevli pyd bölgesi içeren proteinler ile sürekli ilişki halinde olan adaptör proteindir. ASC'nin inflamasyon reaksiyonu ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ne şekilde etkilediği net olarak anlaşılamadığından dolayı ASC geninde ki mutasyonların araştırılması inflamasyon oluşumu hakkında kilit öneme sahip olabilir. Yapılan literatür taramasında ASC gen mutasyonlarını içeren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığından MEFV geninde ki mutasyonlar sorumlu tutulsa da AAA patogenezinde sitokin aktivitelerinde ki değişikliklerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (52). MEFV geni nötrofillerden başka monositlerde ve eosinofillerde de eksprese olmaktadır. TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin yada INF- $\gamma$  gibi Th1 tip sitokinler ile monositlerin in vitro olarak uyarılmaları sonucu MEFV ekspresyonunun arttığı, IL-4, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi Th2 tip sitokinler ile uyarılma sonucu ise MEFV ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Proinflamatuvar sitokinlerin MEFV aktivitesini artırarak Th1 aracılı inflamasyonel yanıtta önemli bir yere sahip olduğunu gösterilmiştir. Th1 aktivitesinin MEFV geni tarafından inhibe edildiği ve bu inhibisyonda ki defektin AAA patofizyolojik bulgulara neden olduğu ileri sürülmüştür (17). MEFV geninin görevi Th1 sitokinleri yada proinflamatuvar mediatörleri inhibe etmek olduğu ve Sitokin ile MEFV gen ifadesinde ki dengesizliğin AAA'nın altta yatan mekanizması olduğu belirtilmiştir (40).

MEFV geninde yaklaşık 80 tane fenotip ilişkili mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonların çoğunluğunu yanlış anlamlı mutasyonlar oluşturmaktadır. 2 insersiyon bildirilmiş, bu insersiyonlardan 390\_391insGAGGGGAAC fenotip ile ilişkilendirilmiştir. 2 duplikasyon bildirilmiş ve bu duplikasyonlardan 606\_621dup fenotip ile ilişkilendirilmiştir. 2 delesyon bildirilmiştir ve fenotiple ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunlar, M694del ve I692del'dir (50).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza Tel-Hashomer kriterlerine göre Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı almış 26 olgu ve sağlıklı 6 kontrol dahil edilmiştir. Strip Assay ile mutasyon saptanamamış 26 olgu MLPA yöntemi kullanılarak var olabilecek genomik değişiklikler açısından incelenmiştir. Ailevi Akdeniz Ateşi'nden sorumlu MEFV geni tüm ekzonları ve promoter bölgelerine özgü MLPA probmiks kiti ile incelenmiş ve herhangi bir mutasyon yada polimorfizme rastlanılmamıştır.

Yeterli ve kaliteli DNA eldesi başarılı bir MLPA reaksiyonu için en önemli aşama olduğu belirlenmiştir. MLPA reaksiyonuna katılan tüm örneklerin eşit miktarda olması sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir.

MLPA yöntemi, PCR temelli bir yöntemidir. Hızlı, ucuz ve güvenilir sonuçlar verebilen tek reaksiyonda elliye yakın gen bölgesini inceleme olanağı tanıyan kolay uygulanabilen bir yöntem olarak adlandırılabilir. MLPA tekniği son yıllarda geliştirilen en önemli moleküler yöntemlerden birisidir.

Sonuç olarak Strip Assay ile moleküler olarak AAA hastası olmadığı belirtilen hastaların çalışmamızda kullandığımız MLPA Salsa P094 Prob kiti ile de moleküler olarak hasta olmadığı belirlenmiştir. MEFV geni için ticari olarak satılan MLPA kitlerine promoter ve ekzon bölgeleri dışında regülatör bölgeleri de inceleyen probmikslarının yer alması mutasyon taşımayan Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının moleküler teşhisi için faydalı olabilir. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığından sorumlu tek gen olan MEFV geni gösterilse de hastalığın patogenezinin tam olarak aydınlatılamamasından dolayı sorumlu olabilecek diğer genlerdeki mutasyonların varlığının ortaya konması Ailevi Akdeniz Ateşi patofizyolojisi için yol gösterici olabilir. Bu hastalığın sadece resesif kalıtım göstermediği durumların da açıklaması olabilir.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Gershoni-Baruch, R., Brik, R., Zachs, N., Shinawi, M., Lidar, M., Livneh, A., 2003, The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever, *Arthritis Rheum*, 48(4), 1149-1155 p.
2. Domingo, C., Touitou, I., Bayou, A., Ozen, S., Notarnicola, C., Dewalle, M., Demaille, J., Buades, R., Sayadat, C., Levy, M., and Ben-Chetrit, E., 2000, Familial Mediterranean fever in the 'Chuetas' of Mallorca: a question of Jewish origin or genetic heterogeneity, *European Journal of Human Genetics*, 8(4), 242-6 p.
3. Yepiskoposyan, L., and Harutyunyan, A., 2007, Population genetics of Familial Mediterranean Fever: a review, *European Journal of Human Genetics*, 15, 911-916 p.
4. Chae, J.J., Aksentijevich, I., and Kastner, D.L., 2009, Advances in the understanding of Familial Mediterranean Fever and possibilities for targeted therapy, *Br J Haematol*, 146(5), 467-468 p.
5. Pras, M., 1998, Familial Mediterranean Fever from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene, *Scand J Rheumatol*, 27, 92-7 p.
6. Barakat, M.H., Karnik, A.M., Majeed, H.W., El-Sobki, N.I., Fenech, F.F., 1986, Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs-A study of 175 patients and review of the literature, *Quartely Journal of Medicine*, 233, 837-847 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

7. Rigante, D., La Torraca, I., Ansuini, V., Compagnone, A., Salli, A., Stabile, A., 2006, The multi-face expression of Familial Mediterranean Fever in the child, European Review for Medical and Pharmacological Science, 10, 163-171 p.
8. Thomas, K.P., 1975, Genetic factors in amiloidosis, Journal of Medical Genetics, 12, 317 p.
9. Goldfinfer, E.S., 1984, Familial Mediterranean Fever -An Update, Departments of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114.
10. The French FMF Consortium, 1996, Localization of the Familial Mediterranean Fever Gene (FMF) to a250-kb Interval in Non-Ashkenazi Jewish Founder Haplotypes, Am. J. Hum. Genet, 59, 603-612 p.
11. Ben-Chetrit, E., Levy, M., 1998, Familial Mediterranean Fever, Lancet, 351, 659-64 p.
12. Lidar, M., Livneh, A., 2007, Familial Mediterranean Fever, The Journal of Medicine, 65, 9 p.
13. Onen, F., 2006, Familial Mediterranean Fever, Rhumatol, 26, 489-496 p.
14. Turkish FMF Study Group, 2005, Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey, Medicine, 84,1 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

15. Matzner, Y., Raymond, E., Partridge, H., Levy, M., and Babior, M., 1984, Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with Familial Mediterranean Fever, *Blood*, 3, 629-633 p.
16. Bhat, A., Stanley, M., Naguwa, M., and Gershwin, E., 2007, *New York Academy of Sciences*, 1110, 201-208 p.
17. Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D.W., Horwitz, E.M., Mansfield, E., Holland, M.S., O'Shea, J.J., Rosenberg, F.H., Malech, H.L., and Kastner, D.L., 2000, The gene for Familial Mediterranean Fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators, *Blood*, 95, 10.
18. Dizdar, O., Kalyoncu, U., Karadag, O., Akdogan, A., Kiraz, S., Ertenli, I., Barista, I., Calguneri, M., 2007, Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ : A link between innate immunity and Familial Mediterranean Fever?, *Elsevier*, 92-95 p.
19. Chae, J.J., Wood, G., Masters, L.S., Richard, K., Park, G., Smith, B.J., and Kastner, D.L., 2006, The B30.2 domain of pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 $\beta$  production, *The National Academy of Science of the USA*, 103, 26.
20. Chae, J.J., Komarow, D.H., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P.P., and Kastner, D.L., 2003, Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis, *Molecular Cell*, 11, 591-604 p.
21. Cook, C.G., 1986, Periodic Disease, Recurrent polyserositis, Familial Mediterranean Fever or simply 'FMF', *Quartely Journal of Medicine*, 60, 233, 819-823 p.



## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

22. Üstek, D., Ekmekçi, C.G., Biricik, F.S., Cakiris, A., Oku, B., Vural, B., Yanar, H., Taviloğlu, K., Özbek, U., and Gül, A., 2007, Association between reduced levels of MEFV messenger RNA in peripheral blood leukocytes and acute inflammation, *Arthritis and Rheumatism*, 56, 1, 345-350 p.
23. Özel, A.M., Demirtürk, L., Yazgan, Y., Avşar, K., Günay, A., Gürbüz, A.K., Gültepe, M., 2000, Familial Mediterranean Fever A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients, *Digest Liver Dis*, 32, 504-9 p.
24. Matzner, Y., Abedat, S., Shapiro, E., Eisenberg, S., Bar-Gil-Shitrit, A., Stepensky, P., Calco, S., Azar, Y., and Urieli-SShoval, S., 2000, Expression of the Familial Mediterranean Fever gene and activity of the C5a inhibitör in human primary fibroblast cultures, *Blood*, 96, 2.
25. Balcı- Peynircioğlu, B., Waite, A.L., Hu, C., Richards, N., Staubach-Grosse, A., Yılmaz, E., and Gumucio, D.L., 2008, Pyrin, Product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, siva, *Journal of Cellular Physiology*, 216, 595-602 p.
26. Touitou, I., 2003, Familial Mediterranean Fever, *Orphanet encyclopedia*, <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>.
27. Hofmann, K., 1999, The modular nature of apoptotic signaling proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 55, 1113-1128 p.
28. Liepinsh, E., Barbals, R., Dahl, E., Sharipo, A., Staub, E., and Otting, G., 2003, The Death-domain fold of the ASC pyrin domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recogniton, *J. Mol. Biol*, 332, 1155-1163 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

29. Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., and Pras, M., 1997, Criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean Fever, *Arthritis and Rheumatism*, 40, 10, 1879-1885 p.
30. Samules, J., Aksentijevich, I., Torosyan, Y., et al, 1998, Familial Mediterranean Fever at the Millennium clinical spectrum ancient mutations and a survey of 100, *American referrals to the national institutes of health*, 77, 268-97 p.
31. Grateau, G., 2004, Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes, *Rheumatology*, 43, 410-415 p.
32. Bakkaloglu, A., 2003, Familial Mediterranean Fever, *Pediatr Nephrol*, 18, 853-859 p.
33. Yu, J-Q., Wu, J., Zhang, Z., Datta, P., Ibrahimi, I., Taniguchi, S., Sagara, J., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E., 2006, Cyropyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF- $\kappa$ B, via ASC oligomerization, *Naure*, 13, 236-249 p.
34. Fietta, P., 2004, Autoinflammatory diseases: the hereditary periodic fever syndromes, *Acta Bio Medica Ateneo Parmense*, 75, 92-99 p.
35. Delibaş, A., Öner, A., Balcı, B., Demircin, G., Bülbül, M., Bek, K., Erdeoğan, Ö., Baysun, Ş., Yılmaz, E., 2005, Genetic risk factors of amyloidogenesis in Familial Mediterranean Fever, *American Journal of Nephrology*, 25, 434-440 p.
36. Kavukçu, S., Türkmen, M., Eroğlu, Y., Canda, T., Yörükoğlu, K., Iğcı, E., and Büyükgebiz, A., 1997, Renal, gastic and throidal amyloidosis due to Familial Mediterranean Fever, *Pediatr Nephrol*, 11, 210-212 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

37. Saatçi, Ü., Ozen, S., Özdemir, S., Bakkaloglu, A., Besbas, N., Topaloglu, R., Arslan, S., 1997, Familial Mediterranean Fever in children: report of a large series and discussion of the risk prognostic factors of amyloidosis, *Eur J. Pediatr*, 156, 619-623 p.
38. Örün, E., Yalçinkaya, F., Özkaya, N., Akar, N., Gökçe, H., 2002, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığında akut faz yanıtı ile tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , interlökin-8 ve interlökin-6 düzeylerinin değerlendirilmesi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 55 2.
39. Celkan, T., Çelik, M., Kasapçopur, Ö., Özkan, A., Apak, H., Ocak, S., Arısoy, N., Yıldız, İ., 2005, The anemia of Familial Mediterranean Fever disease, *Pediatric Hematology and Oncology*, 22, 657-665 p.
40. Notarnicola, C., Didelot, M., Seguret, F., Demaille, J., and Touitou, I., 2002, Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with Familial Mediterranean Fever, *Genes and Immunity*, 3, 43-45 p.
41. Kastner, D.L., 2005, Hereditary periodic fever syndromes, *American Society of Hematology*.
42. Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, D.H., Brotz, M.T., Frucht, D.M., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., 2001, The Familial Mediterranean Fever protein, pyrin associates with microtubules and colocalizes with actin filaments, *Blood*, 98, 851-859 p.
43. Ben-Chetrit, E., Bergmann, S., and Sood, R., 2006, Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis, *Rheumatology*, 45, 274-282 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

44. Onat, A.M., Öztürk, A.M., Özkaçar, L., Üreten, K., Kaymak, S.U., Kiraz, S., Ertenli, İ., and Çalgüneri, M., 2007, selective serotonin reuptake inhibitors reduce the attack frequency in Familial Mediterranean Fever, *J. Exp. Med*, 211, 9-14 p.
45. Örün, E., Yalçınkaya, F., 2003, Türk tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı ve amiloidoz, *Trük nefroloji diyaliz ve transplantasyon degisi I*, 12(1), 1-7 s.
46. The İnternational FMF Consortium, 1997, Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause Familial Mediterranean Fever, *Cell*, 90, 797-807 p.
47. Haddad, J.J., 2009, The role of inflammatory cytokines and NF-κB/MAPK signaling pathways in the evolution of Familial Mediterranean Fever: Curren clinical perspectives and potential therapeutic approaches, *Cellular İmmunology*, 260, 6-13 p.
48. Tekin, M., Yalçınkaya, F., Tümer, N., Çakar, .,N, and Koçark, H., 1999,Familial Mediterranean Fever and Acute Rheumatic Fever: A pathonegetic Relationship ?, *Clin Rheumatol*, 18, 446-449 p.
49. Paut, K.I., Dubuc, M., Sportouch, J., Minodier, P., Garnier, J.M., and Touitou, I., 2000, Phenotype-genotype correlation in 91 patients with Familial Mediterranean Fever reveals a high frequency of cutaneomucous features, *Rheumatology*, 39, 1275-279 p.
50. <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=1>, (2011)
51. <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/schema.php?n=1>, (2011-7-1)

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

52. Musabak, U., Sengul, A., Oktenli, C., Pay, S., Yesilova, Z., Kenar, L., Sanısoglu, S.Y., Inal, A., Tuzun, A., Erdil, A., Bagci, S., 2004, Does immune activation continue during an attack-free period in familial mediterranean fever?, Clin Exp. Immunol, 138, 526-533 p.
53. Touitou, I., 2001, The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations, European Journal of Human Genetics, 9, 473-483 p.
54. Kogan, A., Shinar, Y., Lidar, M., Revivo, A., Langevitz, P., Padeh, S., Pras, M., and Livneh, A., 2001, Common MEFV mutation among jewish ethnic groups in israel: high frequency of carrier and pheotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state, American Journal of Medical Genetics, 102, 272-276 p.
55. Yalçınkaya, F., Çakar, N., Mısırlıoğlu, M., Tümer, N., Akar, N., Tekin, M., Taştan, H., Koçark, H., Özkaya, N., and Elhan, A.H., 2000, Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with Familial Mediterranean Fever: evidence for mutation independent amyloidosis, Rheumatology, 39, 67-72 p.
56. Shotat, M., Magal, N., Shotat, T., Chen, X., Dagan, T., Mimouni, A., Danon, Y., Lotan, R., Ogur, G., Sirin, A., Schlezinger, M., Halpern, G.J., Schwabe, A., Kastner, D., Rotter, J.I., and Fischel-Ghodsian, N., 1999, Phenotype-genotype correlation in Familial Mediterranean Fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis, European Journal of Human Genetics, 7, 287-292 p.
57. Yılmaz, E., Balcı, B., Kutlay, S., Özen, S., Ertürk, Ş., Öner, A., Beşbaş, N., Bakkaloğlu, A., 2003, Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients, The Turkish Journal of Pediatrics, 45, 198-202 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

58. Akarsu, A.N., Saatçi, U., Ozen, S., Bakkaloğlu, A., Beşbaş, N., Sarfarazi, M., 1997, Genetic linkage study of Familial Mediterranean Fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population, *J med Genet*, 34,573-578 p.
59. Stoffman, N., Magal, N., Shotat, T., Lotan, R., Koman, S., Oron, A., Danon, Y., Halpern, G.L., Lifshitz, Y., and Shotat, M., 2000, Higher than expected carrier rates for Familial Mediterranean Fever in various Jewish ethnic groups, *European Journal of Human Genetics*, 8, 307-310 p.
60. Al-Alami, J.R., Tayeh, M.K., Najib, A.D., Abu-Rubaiha, A.Z., Majeed, A.H., El-Khateeb, M.S., El-Shanti, H.I., 2003, Familial Mediterranean Fever mutation frequencies and carrier rates among a mixed Arabic population, *Saudi Med J*, 24(10), 1055-1059 p.
61. Topaloglu, R., Ozaltin, F., Yilmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Besbas, N., Bakkaloglu, A., 2004, E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with Familial Mediterranean Fever, *Ann Rheum Dis*, 64, 750-752 p.
62. Üstek, D., Ekmekçi, C., Oku, B., Coşan, F., Çakiris, A., Abacı, N., Çelik, S., Kamalı, S., Hatemi, G., Kasapçopur, Ö., Özdoğan, H., Gül, A., 2008, MEFV gene 3'UTR Alu repeat polymorphisms in patients with Familial Mediterranean Fever, *Clin Exp Rheumatol*, 26, 72-76 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

63. Yılmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Duzova, A., Topaloglu, R., Besbas, N., Saatci, U., Bakkaloglu, A., and Ozguc, M., 2001, Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population, *European Journal of Human Genetics*, 9, 553-555 p.
64. Federici, L., Rittore-Domingo, C., Kone-Paut, I., Jorgensen, C., Rodiere, M., Le Quellec, A., Touitou, I., 2006, A decision tree for genetic diagnosis of hereditary periodic fever in unselected patients, *Ann Rheum Dis*, 65, 1427-1432 p.
65. Lachmann, H.J., Şengül, B., Yavuzşen, T.U., Booth, D.R., Booth, E.S., Bybee, A., Gallimore, J.R., Soytürk, M., Akar, S., Tunca, M., and Hawkins, P.N., 2006, Clinical and subclinical inflammation in patients with Familial Mediterranean Fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations, *Rheumatology*, 45, 746-750 p.
66. Marek-Yagel, D., Berkun, Y., Padeh, Shai., Abu, A., Reznik- Wolf, H., Livneh, A., Pras, M., and P, E., 2009, Clinical Disease among patients heterozygous for Familial Mediterranean Fever, *Arthritis and Rheumatism*, 60, 6, 1862-1866 p.
67. <http://www.mlpa.com>, (2011)
68. Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwinjnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Oxford University Press*, 30, 12.
69. Kozłowski, P., Jasinska, A.J., Kwiatkowski, D.J., 2008, New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification, *Electrophoresis*, 29, 4627-4636 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

70. Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T., Hornung, V., 2011, Inflammasomes: current understanding and open questions, *Cel. Mol. Life Sci.*, 68, 765-783 p.
71. Masters, L.S., Simon, A., Aksentjevich, I., and Kastner, D.L., 2009, Horror autoinflammaticus: The molecular pathophysiology of autoinflammatory disease, *Annu Rev Immunol*, 27, 621-668 p.
72. Bernot, A., Silva, C., Petit, J.L., Cruaud, C., Caloustian, C., Castet, V., Ahmed-Arab, M., Dross, C., Dupont, M., Cattan, D., Smaoui, N., Dode, C., Pecheux, C., Nedelec, B., Medaxian, J., Rozenbaum, M., Rosner, I., Delpech, M., Grateau, G., Demaille, J., Weissenbach, J., and Touitou, I., 1998, Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of Familial Mediterranean Fever (FMF), *Human Molecular Genetics*, 7,8,1317-1325 p.
73. Van Gijn, E.M., Soler, S., De la Chapelle, C., Mulder, M., Ritorre, C., Kriek, M., Philibert, L., Van der Wielen, M., Frenkel, J., Grandemange, S., Bakker, E., Van Amstel, K.J.P., and Touitou, I., 2008, Search for copy number alterations in the MEFV gene using multiplex ligation probe amplification, experience from three diagnostic centers, *European Journal of Human Genetics*, 16, 1404-1406 p.
74. Marek-Yagel, D., Berkun, Y., Padeh, S., Abu, A., Reznik-Wolf, H., Livneh, A., Pras, M., and Pras, E., 2009, Clinical disease among patients heterozygous for Familial Mediterranean Fever, *Arthritis and Rheumatism*, 60, 6, 1862-1866 p.
75. Booty, G.M., Chae, J.J., Masters, L.S., Remmers, E.F., Barham, B., Le, J.M., Barron, K.S., Holland, M.S., Kastner, D.L., and Aksentjevich, I., 2009, Familial Mediterranean Fever with a single MEFV mutation, *Arthritis and Rheumatism*, 60, 6, 1851-1861 p.



## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

76. Padeh, S., 2005, Periodic Fever Syndromes, *Pediatr Clin N Am*, 52, 577-609 p.
77. <http://www.viennalab.com>, (2011)
78. Tchernitchko, D., Legendre, M., Delahaye, A., Cazeneuve, C., Niel, F., Goossens, M., Amselem, S., Girodon, E., 2003, Clinical Evaluation of a Reverse Hybridization Assay for the Molecular Detection of Twelve MEFV Gene Mutations, *Clinical Chemistry*, 49, 11, 1942-1945 p.
79. Delague, V., Kriegshauser, G., Oberkanins, C., Megarbane, A., 2004, Reverse-Hybridization vs. DNA Sequencing in the Molecular Diagnosis of Familial Mediterranean Fever, *Genetic Testing*, 8, 1, 65-68 p.
80. Oberkanins, C., Weinhausel, A., Kriegshauser, G., Moritz, A., Kury, F., Haas, A.O., 2003, Genetic Testing for Familial Mediterranean Fever in Austria by Means of Reverse-Hybridization Teststrips, *Clinical Chemistry*, 49, 1948-1950 p.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı :Cem KARAOSMANOĞLU  
Doğum tarihi ve yeri :1985 Ankara  
Uyruğu :T.C.  
Adres :Büyükdere mah. Ediphan sok. Dilay apt. A blok No:33  
D:6 Odunpazarı/Eskişehir  
e-mail :cemkaraosmanoğlu@hotmail.com

### Eğitim Durumu

İlkokul :Eczacıbaşı İlköğretim Okulu (1991)  
Lise :Fenerbahçe Lisesi (1999)  
Lisans :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2003)  
Yüksek Lisans :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (2008)  
Yabancı Dil :İngilizce

