

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

**İNSAN LÖKOSİT ANTİJENİ (HLA)-B27 POZİTİF VE  
B27 NEGATİF ANKİLOZAN SPONDİLİT TANILI  
HASTALARDA MEFV GEN MUTASYONLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Bio. Selin TAN**

**Referans no: 10072577**

EDİRNE-2015

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

**İNSAN LÖKOSİT ANTİJENİ (HLA)-B27 POZİTİF VE  
B27 NEGATİF ANKİLOZAN SPONDİLİT TANILI  
HASTALARDA MEFV GEN MUTASYONLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Bio. Selin TAN**

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2011/129

EDİRNE-2015

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ Sağlık  
Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç.Dr. Hilmi TOZKIR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Selin TAN tarafından tez başlığı “ İnsan Lökosit Antijeni (HLA)-B27 Pozitif ve B27 Negatif Ankilozan Spondilit Tanılı Hastalarda MEFV Gen Mutasyonlarının Araştırılması” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 30/03/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Yüksek Lisans Tezi” olarak kabul edilmiştir.

İmza

Ünvanı Adı Soyadı  
JÜRİ BAŞKANI

Doç.Dr. Tammam SİPAHİ



İmza

Ünvanı Adı Soyadı

ÜYE

T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Mrk.  
Yr.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Dip.No:2010 Dip.Tes.No:91816

İmza

Ünvanı Adı Soyadı

ÜYE

T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Mrk.  
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Dip. Tes. No. 22773/26241

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve emeğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'a, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimlerinin yanı sıra manevi desteğini de esirgemeyerek desteğini hep hissettiğim değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'a, çalışmanın her aşamasında destek veren değerli hocalarım Prof. Dr. Nurettin TAŐTEKİN ve Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, yüksek lisans eğitimim süresince her türlü alanda yardımlarını esirgemeyen ve benimle paylaşan Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.'daki değerli arkadaşlarım Gülce SARI, Metin YAZAR, Ayten DOĞAN ve Damla EKER'e, projemizi destekleyen TÜBAP Başkanlığı'na, eğitim hayatımın tüm süresince her an yanımda olan, beni hep destekleyen ve manevi yönden huzur veren bundan sonra da yanımda olacağını bildiğim, tüm bu güzellikleri yaşamamı sağlayan canım anneme, babama, halama ve enişteme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>ANKİLOZAN SPONDİLİT</b> .....	3
<b>MEFV GENİ</b> .....	11
<b>OTOİNFLAMATUAR HASTALIK</b> .....	14
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	17
<b>BULGULAR</b> .....	25
<b>TARTIŞMA</b> .....	38
<b>SONUÇLAR</b> .....	41
<b>ÖZET</b> .....	43
<b>SUMMARY</b> .....	45
<b>KAYNAKLAR</b> .....	47
<b>TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	52
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	54
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AAA</b>	: Ailesel Akdeniz Ateşi
<b>AS</b>	: Ankilozan Spondilit
<b>ASC</b>	: Apoptosis Speck Protein
<b>CARD</b>	: Caspase Recruitment Domains
<b>CTL</b>	: Cytotoxic T Lymphocytes
<b>DED</b>	: Death Effector Domains
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>ERAP1</b>	: Endoplazmik Retikulum Aminopeptidase1
<b>GWAS</b>	: Genome-Wide Association Study
<b>HC</b>	: Heavy Chain
<b>HLA</b>	: Human Leukocyte Antigen
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MEFV</b>	: Mediterranean Fever
<b>MHC</b>	: Major-Histocompability-Complex
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>Non-MHC</b>	: Non-Major-histocompability-Complex
<b>PyD</b>	: Pyrin Domain
<b>PCR-SSP</b>	: Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primers
<b>SNP</b>	: Single nucleotide polymorphism
<b>TNF</b>	: Tumor Necrosis Factor
<b>UPR</b>	: Unfolded Protein Response

## GİRİŞ VE AMAÇ

Ankilozan Spondilit (AS), sakroileit ve spondilite dayalı otoinflamatuvar bir hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir, patogenezinde çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. AS ile İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigene-HLA) arasındaki ilişkiye yönelik yapılan çalışmalar sonucunda AS hastalarının % 90'ında HLA-B\*27 (+) bulunmuştur. Ayrıca AS hastalarının çok azında amiloidoz olduğu belirtilmiştir (1).

Otoinflamatuvar hastalıklar grubunda yer alan diğer bir hastalık Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA)'dir. AAA hastalığına neden olan mutasyonlar Mediterranean Fever (MEFV) geni üzerinde belirlenmiştir. MEFV geni pyrin proteinini kodlamaktadır. Mutasyon sonucu Pirin proteininde meydana gelen değişiklikler, apoptozis sürecine girmesi beklenen lökositlerin yaşamaya devam etmesine ve bunun sonucunda çok hafif bir etkileşimde bile şiddetli inflamasyon ortaya çıkarmasına neden olmaktadır.

Araştırmamızda, AS ve MEFV geni arasında bir ilişki olup olmadığı; HLA\*B27 (+) ve (-) AS hastalarında MEFV mutasyonu görülme sıklığının farklılıkları, MEFV geni ile olan ilişkisi ve AS hastalarının cinsiyet dağılımlarına bakılarak MEFV geninde meydana gelen mutasyonların cinsiyet ile ilişkisi gibi sorulara cevap aranmaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ya AS ile HLA-B\*27 arasındaki ilişki incelenmiş ya da AS ile MEFV geni arasındaki ilişkiye bakılmıştır.

Bu çalışmadaki amacımız, HLA-B\*27'si (+) ve (-) olan AS hastalarında MEFV gen mutasyonları açısından elde edilen sonuçları HLA-B\*27'si (-) olan sağlıklı kontrol grubundaki MEFV mutasyonu sıklığı ile karşılaştırarak her üç gruptaki MEFV gen mutasyonları sıklığını belirlemektir. Buna ek olarak, Türk popölasyonun da sık görölen yirmi iki MEFV mutasyonun her birinin gruplar arasındaki dağılımını araştırmaktır.



## GENEL BİLGİLER

### ANKİLOZAN SPONDİLİT

Ankilozan Spondilit (AS), etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, sakroileit ve spondilite dayalı inflamatuvar sırt-bel ağrısına neden olan, patogenezinde çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin rol oynadığı bilinen bir hastalıktır. Temelde aksiyal sistemi tutan bağların ve kas kirişlerinin kemiğe yapıştığı bölgelerde iltihaplanmaya sebep olabilen bunun yanı sıra iris iltihaplanması, cilt lezyonları ve bağırsak iltihaplanmasına neden olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (2,3).

“Ankylosing Spondylitis” terimi füzyon veya yapışıklıklar anlamına gelen Yunanca “ankylos” (eğilmiş) ve “spondylos” (omur) sözcüklerinden türemiştir.

### Tarihçe

Ankilozan Spondilit ilk defa 1691 yılında İrlandalı Dr. Bernard Connor tarafından patolojik olarak Fransız mezarlığından çıkartılan ankiloze bir iskelette tanımlanmıştır. 1841’de Brodie ara sıra göz inflamasyonu ve ankiloze omurgası olan 31 yaşında bir erkek hasta tanımlamıştır. Bunu 1893 yılında Von Bechterev’in, 1897 yılında Struempell’in ve 1898 yılında Marie’nin olguları izlemiştir (1).

Ankilozan Spondilit’in tanısında 1961’de Roma AS kriterleri belli bir süre kullanıldıktan sonra, 1966’da New York kriterleri yayınlanmış ve uzun süre kullanılmıştır (Tablo 1). Günümüzde halen 1984 yılında modifiye edilen New York kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 2) (1).

**Tablo 1. 1966 New York kriterleri (1)**

1. Lomber hareketin üç planda kısıtlı olması (fleksiyon, ekstansiyon ve lateral fleksiyon)
2. Lomber omurgada veya dorsolomber bölgede ağrı
3. Göğüs ekspansiyonunun 2,5 cm'den az olması (4. İnterkostal aralıktan)

**Tablo 2. Modifiye New York kriterleri (1)**

1. 3 aydan uzun süren, egzersiz ile rahatlayan, istirahat ile düzelmeyen bel ağrısı
2. Lomber omurga hareketinin frontal ve sagittal düzlemde kısıtlanması
3. Yaş ve cinse göre göğüs ekspansiyonunun azalması
4. Bilateral Evre 2-4 sakroileit
5. Bilateral Evre 3-4 sakroileit (Kesin AS: 4 ve 5. Madde +1 klinik kriter )

Ankilozan Spondilit’de genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. HLA-B\*27, AS’de genetik yatkınlık belirleyici faktördür (4). Non-Major-histocompatibility-complex (non-MHC) gen polimorfizmleri, HLA-B\*27 ile birlikte immünolojik yanıt sisteminde değişikliklere neden olmaktadır. Meydana gelen bu değişiklikler immünolojik yanıtta farklılıklara yol açarak AS’ye olan genetik yatkınlığı arttırmaktadır (5).

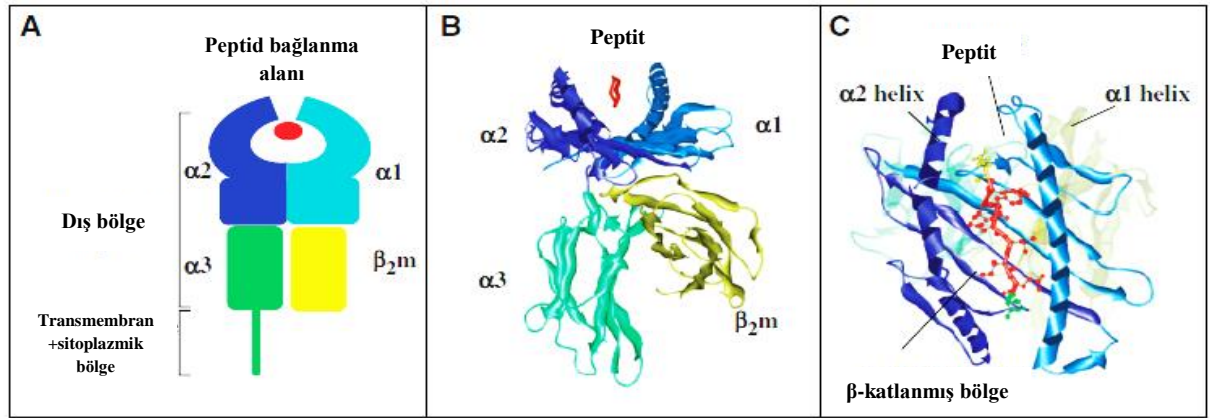
### **HLA-B\*27 ve Yapısı**

HLA-B\*27, edinsel immün yanıtın bir parçası olarak, temel fonksiyonu hücre kökenli peptidleri cluster of differentiation 8 pozitif (CD8+) , sitotoksik T lenfositlerine (CTL) sunmak olan MHC sınıf I molekülüdür. Buna ek olarak MHC sınıf I moleküller, Natural Killer (NK-doğal öldürücüler) hücreler üzerindeki doğal immün düzenleyici reseptörlerle bağlantıya girerek doğal yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynarlar (6).

Normal fizyolojik şartlar altında HLA-B\*27 ağır zincirleri beta 2 mikroglobulin ( $\beta$ 2-m) ve kendi proteinlerinden, ayrıca virüs ve bakteri kaynaklı hücre içi peptidlerden heterotrimerik kompleksler oluştururlar (Şekil 1). Bu heterotrimerik yapılar CTL tanınması için hücre yüzeyine çıkar (7). Bununla birlikte, HLA-B\*27 ağır zincirler,  $\beta$ 2-m bağımsız disülfid bağlı ağır zincir homodimerleri oluşturabilirler. Bu HLA-B\*27 homodimerlerinin her ikisi de olgunlaşma sırasında intrasellüler olarak (hücre içi) toplanır ve heterotrimerlerin endozomal dönüşümünün ardından hücre yüzeyinde de eksprese olurlar. HLA-B\*27’nin, 67. pozisyonundaki (Cys 67) çiftleşmemiş sistein üzerinden disülfid bağları oluşturması beklenmedik olsa da bu bağlar hücre yüzeyi homodimer ekspresyonu için oldukça kritiktir.

HLA-B\*27 homodimerleri ise T, NK ve myeloid hücreler (insan ve kemirgenler) üzerindeki çeşitli doğal immün reseptörlerine bağlanırlar (6).

HLA-B\*27'nin kristal yapısı ilk olarak Madden ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Özellikle peptidin 2. pozisyonundaki arjinin yapısına yerleşmiş olan  $\beta$  bölgesiyle ilişkili, peptid bağlama oluşu içinde bazı farklılaşmış özellikler ortaya çıkarır (Şekil 1). Aksine çoğu diğer sınıf I moleküller, HLA-B\*27, B bölgesinde Cys 67 çiftleşmemiş sistein yapısına sahiptir. Bu yapı  $\beta$ 2-m olmayan disülfid-bağlı HLA-B\*27 ağır zincir (Heavy Chain-HC) homodimerlerinin oluşumunda gösterilmiştir. Cys 67 HLA-B\*27'ye özel değildir. Bilinen diğer beş B aleli de bu serbest sisteine sahiptir; HLA-B\*14, -B\*15, -B\*38 B\*39 ve -B\*73(6) . Çok az çalışmada bu diğer HLA-B' lerin homodimer oluşumu araştırılmıştır ve Merino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HLA-B\*14'ün transfekte B hücre hatlarında homodimerler oluşturduğu kanıtlanmıştır (7).



**Şekil 1. Major-Histocompatibility-Complex sınıf I molekülünün yapısı (7)**

**A:** MHC sınıf I molekülünün şematik görüntüsü üç ağır zincir (açık mavi koyu mavi ve yeşil), non kovalent bağ ile bağlı  $\beta$ 2-m (sarı) ve heteromerik yapıda olan peptid (kırmızı). **B-C:** HLA-B\*27 kristal yapısı. B) Peptid ile birlikte HLA-B\*27 Ribbon modelinin şematik görüntüsü. C) Peptid bağlama oluklarının görüntüsü, 8 adet  $\beta$  anti-paralel iplik ve 2 adet  $\alpha$  helix iplik platformu.

İnsan Lökosit Antijen molekülü, ilk önce endoplazmik retikulum (ER) içinde serbest ağır zincir olarak üretilir daha sonra bu üretilen moleküle  $\beta$ 2-m ve antijenik peptitler eklenir. Bütün bileşenler eklenince molekül olgun hale gelir ve hücre yüzeyine taşınır. Bileşenlerin farklı fazlarda eklenmesi sırasında molekül farklı yapılar kazanır. Bu olay 'katlanma' olarak adlandırılır. Molekülün katlanma hızı da sonucunu belirler. Çünkü HLA-B\*27 diğer HLA alellerinden çok daha yavaş katlanması açısından farklıdır. Molekül bu evreye geçmeden önce katlanmamış durumdadır (8).

HLA-B\*27'nin diğer HLA sınıf I moleküllerinden farkı daha uzun peptidlere bağlanma yeteneğidir. Uzunluğu 33 aminoasitten fazla olan peptidler HLA-B\*27'den ayrıştırılır. Bu uzun peptidlere bağlanmasının bir sonucu olarak, HLA-B\*27 molekülü için katlanmış yapısının belki daha fazla gevşemesi olası bir sonuçtur. Daha fazla gevşemiş yapılar, katlanmayan veya dimerizasyona daha fazla eğilimli bir molekül havuzu oluşturursa, bu durum HLA-B\*27 yanlış katlanması ve/veya homodimer oluşumu için önemli etkilere sahip olabilir. HLA-B\*27'nin ilave atipik özellikleri ER'de toplanması ve hücre yüzeyine çıkarılmasıyla ilişkilendirilmiştir (9, 10).

HLA-B\*27 katlanması patojeniteye katkıda bulunabilen iki atipik özellik ortaya koyar;

1- Ağır zincirin katlanması diğer sınıf I moleküllerden daha yavaş olabileceği görülür. Bunun sonucu olarak, normal peptid ve  $\beta$ 2-m varlığında bile ER'de sentezi takiben yanlış katlanma eğilimine sahip olur (11, 12).

2- HLA-B\*27 yüzey ekspresyonu için diğer sınıf I molekülleriyle karşılaştırıldığında daha az tapasine bağımlıdır. Yüzeyde ayrılabilen bu daha zayıf bağlarla bağlı peptidle yüklü HLA-B\*27 komplekslerin ER'den çıkmasıyla sonuçlanır. Bununla uyumlu olarak, Benjamin ve arkadaşları peptid alıcı yapısıyla hücre dışı peptidlere bağlanabilen, B hücre yüzeyinde HLA-B\*27'nin uygun boş formlarının varlığını bildirmiştir. Boş yüzey MHC-I molekülleri ayrıca diğer sınıf I alellerini eksprese eden hücre hatlarında da görülebilir fakat düşük sıcaklık induksiyonuna ihtiyaç duyar. Sonuç olarak heterotrimerlerin oluşumuna izin veren boş B\*27 molekülleri ER'de yetersiz peptid yüklemesine neden olur. Peptid olmadan, hastalık patogenezinde katkıda bulunabilen yüzeyde serbest ağır zincir desteğinden ayrılmasıyla  $\beta$ 2-m ayrıştırır (13).

### **HLA-B\*27'nin AS Hastalığındaki Rolü**

HLA-B\*27 ile AS arasındaki ilişkinin patofizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir. İmmün hastalıklarla ilişkisi ilk olarak 1973 yılında bildirilmiştir. Beyaz tenli AS'li hastaların yaklaşık olarak % 90'ında HLA-B\*27 pozitifliği görülmektedir (14).

HLA-B\*27'nin AS ile ilişkisinin 1973 yılında ilk kez gösterilmesinden bu yana geçen yaklaşık 40 yıllık sürede, HLA-B\*27'nin AS patogenezinde üstlendiği rolü araştıran birçok çalışma mevcuttur.

HLA-B\*27, tek bir alel değildir; şu ana kadar en az 133'den fazla isimlendirilmiş üyeden oluşan bir ailedir ve yapılan çalışmalar ile birlikte bu sayı daha da artmaktadır.

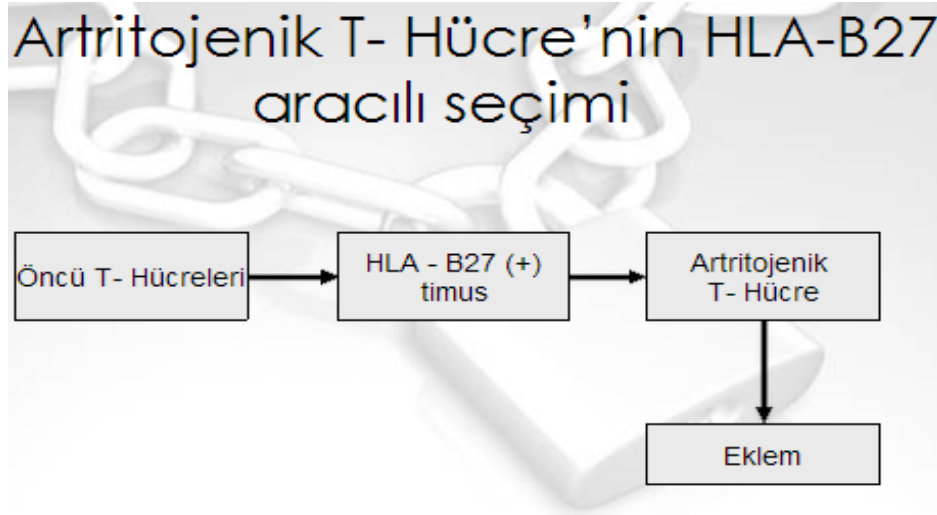
Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde AS ile en çok ilişkilendirilen alt tipler HLA-B\*2702, HLA-B\*2704 ve HLA-B\*2705'dir (15).

AS patogenezinde etkisi tam olarak bilinmemesine rağmen, HLA-B\*27 ile ilgili HLA-B27'nin rolüne ait üç teori vardır (6);

- 1) Artritojenik peptid hipotezi,
- 2) HLA-B\*27 Yanlış Katlanma ve UPR Hipotezi,
- 3) HLA-B\*27 ağır zincir ve homodimer hipotezi.

Bunlar sırasıyla;

**1) Artritojenik peptid hipotezi:** Artritojenik peptid hipotezi, HLA-B\*27'nin hastalık patogenezinde yer almasını inceleyen ilk ve en kapsamlı hipotezdir. Artritojenik peptid hipotezine göre hastalık, HLA-B\*27'nin benzersiz artritojenik peptidlere bağlanarak bu peptidleri CD8+ CTL'lere sunum kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bu yolakta, patojen kaynaklı peptidler sonucu tetiklenen HLA-B\*27 ile ilişkili sitotoksik T lenfositlerin (CTL) yanıtı, HLA-B\*27'ye bağlanmış otopeptidlerle çapraz reaksiyon verir. Bu çapraz reaksiyon ER'de inflamatuvar yanıtla sonuçlanmaktadır (Şekil 2) (16, 17).



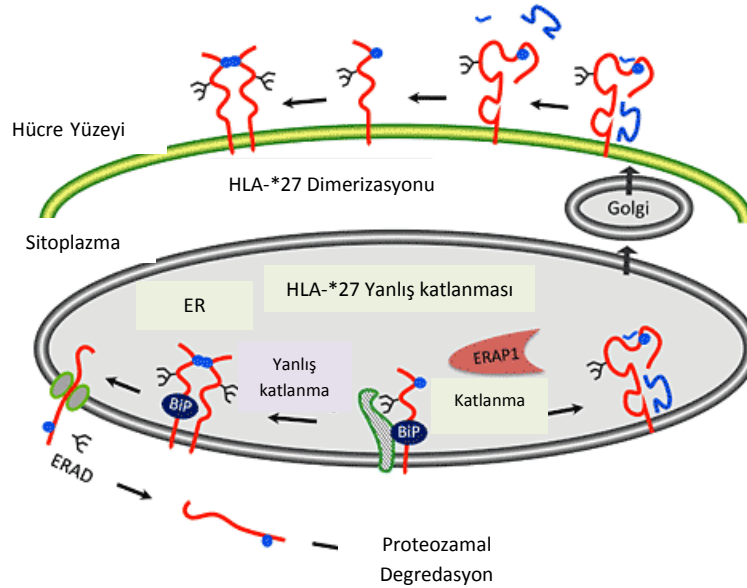
Şekil 2. Artritojenik peptid sunumu (18)

**2) HLA-B\*27 yanlış katlanma ve UPR hipotezi:** HLA-B\*27 yanlış katlanma hipotezi;

- a) Hastalığın, normal olmayan HLA-B\*27 katlanması birikimi, HLA-B\*27 yanlış katlanması ile ilgilidir.

b) Katlanmamış protein yanıtı hipotezi (UPR) ise HLA-B\*27 olmayan ağır zincir ve homodimer hipotezinden kaynaklandığını öne sürmektedir.

Bu iki teori hem hücre yüzeyinde hem de ER içinde yanlış katlanmasının sonucu olarak anormal katlı moleküllerin oluşumu için incelenmiş ve de hastalıkla HLA-B\*27 arasındaki ilişki gösterilmiştir (15). HLA-B\*27 antijeninin spondiloartropatilerde sağlıklı insanlara göre daha fazla yanlış katlanma ihtimali vardır (Şekil 2). İmmüoglobülin bağlayan protein (BiP), ER stresi esnasında normal düzeyden fazla eksprese olmaktadır. Yanlış katlanmış HLA-B\*27 ağır zincirlerinin birikimi sonucunda BiP'e bağlanan ağır zincirler ER stresine neden olmaktadır (8).



Şekil 3. HLA B\*27 yanlış katlanma hipotezi (19)

**3) HLA-B\*27 ağır zincir ve homodimer hipotezi:** Son yıllarda yapılan çalışmalar, aşırı yüklü ER yanıtı (EOR)'nin kaspaz 3 ve 12 aktivasyonu aracılığıyla apoptozisi ve ER'dan  $Ca^{2+}$  salınımını tetikleyebileceğini göstermektedir. Yanlış katlanma teorisinde belirtilen ER'de HLA-B\*27 homodimerlerinin birikimi ER stres yanıt yolağını aktive eder. Bu da hastalık patogeneze katkı sağlayan proinflamatuvar sitokinlerin salınımıyla sonuçlanır. Bu hipoteze destek sağlayan ilk çalışmalar transgenik hayvan çalışmalarıdır ve hastalığa meyilli HLA-B\*27 transgenik sıçanların splenosit ve makrofajlarında yanlış katlanmış HLA-B\*27 birikimi görülmektedir. Aynı zamanda yanlış katlanmış HLA-B\*27'lerin ER şaperon proteinini BiP'e bağlanma afinitesi daha fazladır. BiP şaperon proteinine bağlanma, HLA-B\*7,

sıçanlarda görülmemiştir ve görünüşe göre Cys 67 yapısı bağımsızdır. Ayrıca, AS hastalarından alınan hücrelerle yapılan çalışmada UPR aktivasyonu hücrelerin yapışkan (adheran) kısmında görülmemiştir (20).

İkinci hipoteze göre katlanmamış HLA-B\*27 proteinlerinin ER'de oluşturduğu UPR stresi inflamatuvar yanıtı sebep olmaktadır. Üçüncü hipotez ise fizyolojik şartlarda oluşan HLA-B\*27 homodimerlerinin 67. Pozisyondaki sistein yapısının disülfid bağı ile stabilize olmasına dayanmaktadır. 67. Pozisyondaki sistein yapısının disülfid bağı oluşturamazsa stabil olmayan HLA-B\*27 öncü molekülleri ortaya çıkar. Bakteriyel infeksiyon yada hipoksi sonucu hücre yüzeyinde HLA-B\*27 ağır zinciri ve HLA-B\*27 homodimerlerinin oluşumu tetiklense de yanıt olarak stabil olmayan HLA-B\*27 öncü moleküllerinin kullanılması sonucu doğal bağışıklık sistemi uyarılır ve inflamasyon ortaya çıkar (6).

### **Ankilozan Spondilit Genetiği- Tüm Genom İlişkilendirme Çalışmaları Çağı (Genome-Wide Association Study (GWAS))**

Ankilozan Spondilitin kökeninde ağırlıklı olarak genetik faktörler etkili olduğundan, AS'deki genetik çalışmalar oldukça verimlidir. AS ile HLA-B\*27 ilişkisi ilk olarak inflamatuvar hastalıklardaki HLA alellerinde tanımlanmıştır. HLA-B\*27 ve AS arasındaki ilişki bilinen en önemli genetik ilişkidir. Sağlıklı popülasyonda HLA-B\*27'ye % 10 oranında rastlanırken hastaların % 90' en az bir HLA-B\*27 aleli taşımaktadır (21). Daha az yaygın olsa da belirgin bir ilişki spondiloartropati (SpA) ailesi diğer üyelerinde de ayrıca görülmektedir. Dahası, HLA-B\*27 homozigotluğu klinik tabloyu etkilememesine rağmen, hastalık oluşum riskini 3 katına çıkartmaktadır (6).

Monozigotik ve dizigotik ikiz çalışmalarında, AS'ye % 90 yatkınlığın genetik olarak bağlantılı olduğu hesaplanmıştır. Böylece, genel popülasyonda sadece % 0.1 görülme sıklığı ile karşılaştırıldığında monozigotik ikizler ve birinci derece akrabalar arasında AS için tekrarlanma riski sırasıyla % 63 ve % 8.2'dir. Riskin yaklaşık olarak üçte biri HLA-B\*27'ye geri kalanı (yani 2/3) hem MHC hem de MHC dışı bölgeleri de içeren diğer 15-50 genle ilişkilendirilmektedir. GWAS'dan elde edilen en dikkate değer bulgular 2007'de Welcome Trust Vaka Konsorsiyumu ve Australo-Anglo-American Spondilit Artirit Konsorsiyumunda (WTCC-TASC) ilk kez yapılan çalışmadır. Bu çalışma kapsamında, 1000 AS hastası ve 1500 sağlıklı birey ele alınmış ve 14436 kodlanan tek nükleotid polimorfizmini (SNPs) incelenmiştir. GWAS'dan elde edilen veriler, ER aminopeptidase1 (ERAP1) ve interleukin 23 reseptör (IL-23R) ile güçlü bağlantıyı kanıtlamıştır (22). 2011 tarihinde yapılan TASC

çalışması daha geniş kapsamlı olup 2053 AS vakası ile 5140 sağlıklı bireyi içermektedir.. Bu çalışmalara ilaveten yapılan başka çalışmalar ile 11 gen daha belirlenmiştir; *RUNX3*, *TNFR1/LTBR*, *IL-12B*, *PTGER4*, *TBKBP1*, *ANTXR2*, *CARD9*, *IL-1R2*, *TRADD*, *STAT3* ve *KIF21B*. Bu genler, AS patogenezinde IL-23 yolağının önemli olduğunu göstermektedir (23, 24).

### **ERAP1 ve Ankilozan Spondilit İle İlişkilendirilmesi**

ERAP1; HLA sınıf I molekülüne bağlanabilmesi amacıyla uygun uzunluğa inmek için ER peptidleri kesmek birincil görevi olan aminopeptidaz enzimdir. İlginç bir şekilde, WTCCC2-TASC çalışması, ERAP1 AS hastalık ilişkisinin B\*27 (+) vakalarla sınırlandığını kanıtlamıştır. Bu bulgular, poligenik hastalıklarda gen-gen ilişkisinin ilk örneklerinden birini sunar. AS patogenezinde HLA-B\*27, hücre biyolojisi ve antijen sunucu fonksiyon merkezi durumunda yer alır (25, 26).

Peptidlerin 8 veya 9 aminoasitlik ayrı parçalara bölünmesinde, ERAP1'in moleküler bir yönetici olarak görev aldığı görülür. Açık ve kapalı konformasyonlarda ERAP1 kristal yapılarının günümüzdeki belirlenmeleriyle, teori gelecek desteği kazanmıştır. Hastalık patogenezi ile ilişkide, AS-bağlantılı fakat büyük olasılıkla koruyucu alel olan rs31087 (K528R), polimorfizmi, azalmış peptid kesme yeteneğine sahip olabilir (27). Çeşitli açıklamalar tartışılan ERAP-hastalık bağlantısını açıklamak için önerilebilir. Böylece, ERAP1 fonksiyonundaki azalma HLA-B\*27'ye bağlanabilen peptid çeşidini değiştirecektir. ERAP1 fonksiyonundaki azalma sırasıyla artritogenik peptid (artrite yol açan peptid) sunumunun ve ER'de yanlış katlanmış HLA-B\*27 kompleks oluşumunun azalmasını sağlar.

### **IL-23R ve AS İle İlişkilendirilmesi**

İnterleukin-23R (IL-23R); genellikle hafıza T hücreleri, aktive olmuş T hücreleri, T hücrelerin klonal çoğalmasıyla oluşan yeni T hücreleri ile doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından eksprese edilen sitokin reseptörüdür. IL-23R, az da olsa dendritik hücreler, makrofajlar ile monositlerde de eksprese olmaktadır. IL-23R ve AS ilişkisi ilk kez WTCCC-TASC çalışmasıyla gösterilmiş olsa da daha sonra yapılan bir çok popülasyon çalışmalarıyla da desteklenmiştir (28).

IL-23/IL-23R sinyal yolağı, pro-inflamatuar Th17 CD4 T-hücrelerinin terminal farklılaşması için esastır. IL-23R'nin AS patogenezinde rol aldığının gösterilmesi, Th17 hücrelerin de AS patogenezinde etkili olduğunun bir kanıtıdır. IL-23R'nin rol aldığı yolda

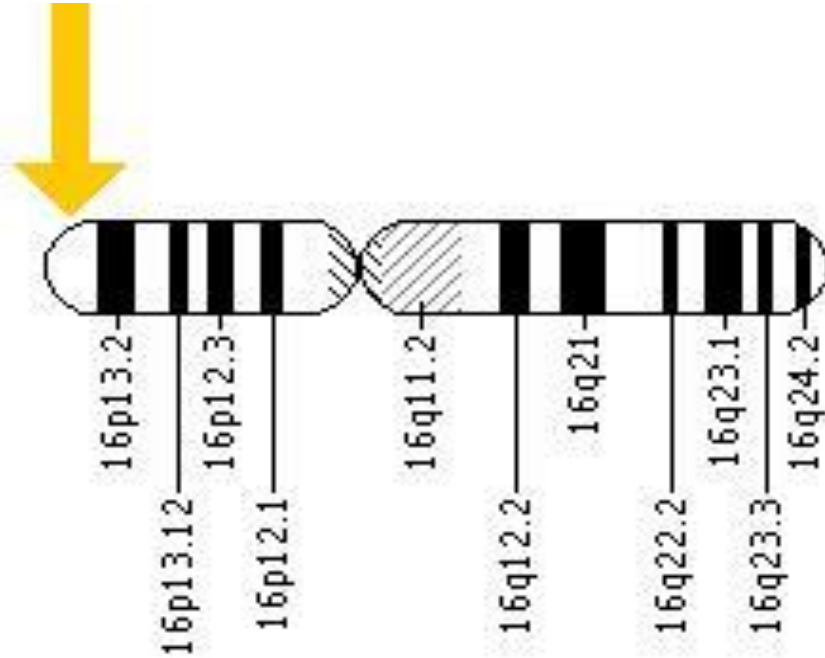


görevli olan STAT3, IL-12B, CARD9 ve PTGER4 genleri de yine potansiyel hedefler olarak incelenmektedir. IL-23R'nin AS ile ilişkisinin gösterilmesinin ardından, IL-23R ile diğer otoimmün hastalıkların olası ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalar da önem kazanmıştır (29, 30).

### MEFV GENİ

Mediterranean Fever (MEFV) geni 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yerleşmiş olup 781 aminoasitli pyrin proteinini kodlamaktadır (Şekil 4). İlk kez 1997 yılında Ailevi Akdeniz Ateşi (Familian Mediterranean Fever –FMF) Hastaları'nda MEFV geninde mutasyon olduğu gösterilmiş ve aralarındaki ilişki ispatlanmıştır (31, 32). MEFV geninin kodladığı proteine 1997 yılında iki ayrı uluslararası araştırma grubu tarafından isim verilmiştir (Fransız FMF Konsorsiyumu ve Uluslararası FMF Konsorsiyumu). Proteine Fransız grubu "Marenosttrin: Akdeniz", diğer grup ise "Pyrin: Ateş" ismini vermiştir (32). Pyrin proteinin, AAA atakları başladığında inflamasyonun olduğu bölgede nötrofillerin aktivitesini kontrol ettiği ve inflamasyonu inhibe etmekle görevli olduğu belirtilmiştir (31).

Fransız ve Uluslararası Konsorsiyum tarafından 1997'de tanımlanan MEFV geni otoinflamatuvar bir hastalık olan AAA'da bilinmeyen bir işleve sahiptir (33).



Şekil 4. MEFV geninin 16. Kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olduğu yer (34)

## **Ülkelere Göre Sık Görülen MEFV Mutasyonları (19)**

### **İsrail**

Kuzey Afrikalı Yahudiler; M694V, E148Q

Iraklı Yahudiler; V726A, p.M694V, p.E148Q, p.M680I

Askenazi Yahudileri; E148Q, p.V726A

### **Orta Doğu**

Araplar; V726A, p.M680I, p.M694V, p.M694I, p.E148Q

### **Türkiye**

Türkler; M694V, p.M680I, p.V726A, p.E148Q

### **Ermenistan**

Ermeniler; M694V, p.M680I, p.V726A, p.E148Q

### **Japonya**

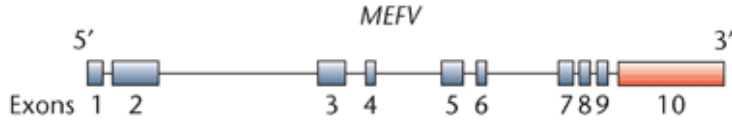
Japonlar; M694I, L110P, E148Q, R761H, E84

## **Pyrin Proteini**

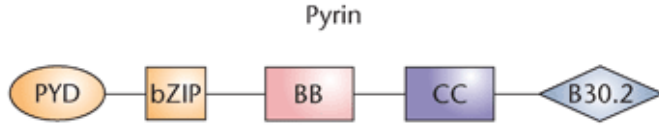
Mediterranean Fever geni pyrin proteinini kodlamaktadır. Mutasyon sonucu Pyrin proteininde meydana gelen değişiklikler, apoptozis sürecine girmesi beklenen lökositlerin yaşamaya devam etmesine ve bunun sonucunda çok hafif bir etkileşimde bile şiddetli inflamasyon ortaya çıkarmasına neden olmaktadır (35, 36).

İnflamasyon oluşumunda rol oynayan en önemli faktörlerden biri İnterlökin 1 (IL-1)'dir. Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki çeşittir. Tip 1 IL-1 reseptörü T hücreleri, monosit, fibroblast, kondrositler ve sinovyal hücrelerde eksprese olurken Tip 2IL-1 nötrofiller, Bhücreleri ve makrofajlarda eksprese olur (37).

Pyrin proteini 4 farklı bölge içerir. Bunlar, N-terminal ucundaki 92 amino asitlik pyrin domaini (PYD), C-terminal ucundaki B30.2/rfp/SPRY domaini, bunların arasına yer alan B-box ve coiled-coil (CC) kısımlarıdır (Şekil 5) (38).



(a)



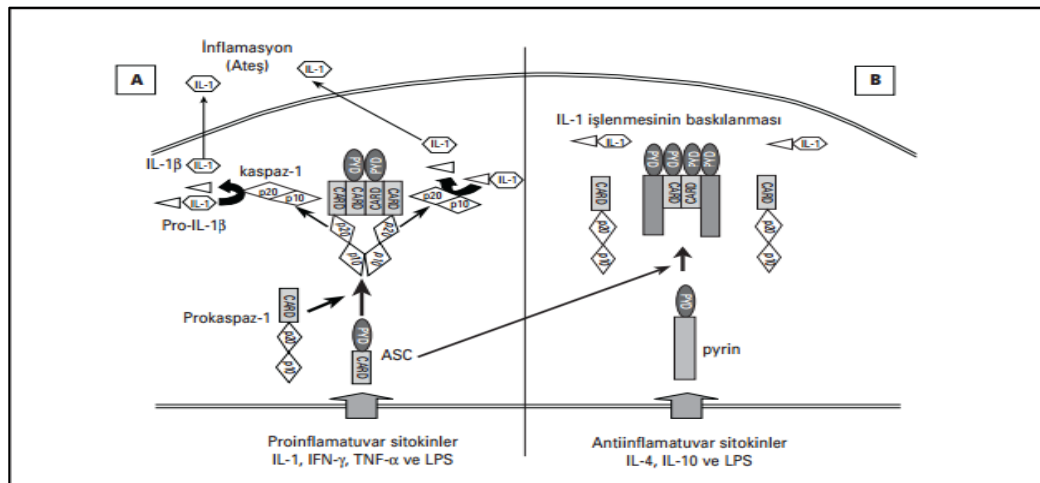
(b)

**Şekil 5. a) MEFV gen ekzonları, b)Pyrin protein domainleri (39)**

Çeşitli proteinlerde de yer alan amino terminal bölgesine benzer proteinlere pyrin domaini (PyD) adı verilmiştir (9). Ölüm domaini süper ailesinine ait PyD 95 amino asitten oluşmaktadır. Ölüm etkileyici domainleri (death effector domains, DED) ve kaspaz iyileştirici domainleri (caspase recruitment domains, CARD) apoptosis ve inflamasyon yollarında yer alan proteinlerle etkileşebilmektedir. PyD ve CARD proteinleri birleşerek küçük bir adaptör proteini olan “apoptosis speck proteini” (ASC)’yi oluşturmaktadırlar.

Apoptosis speck proteini üç yolda görev alır;

- 1- Apoptoz
- 2- İnterlökin-1 beta işlenmesi
- 3- Prokaspaz-1’in işlenmesi ve salgılanması (Şekil 6) (40).

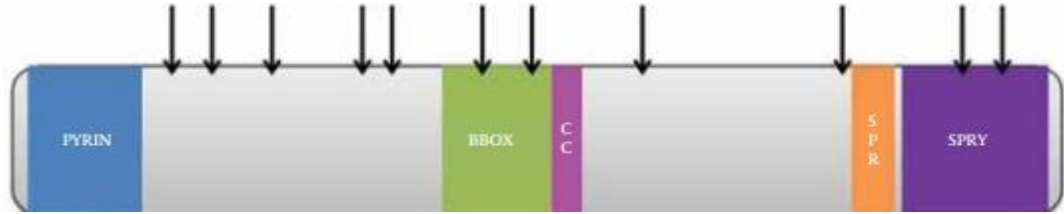


**Şekil 6. Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilişkinin şematik gösterimi. A: LPS ve proinflamatuvar sitokinler ASC’yi tetikleyerek prokaspaz-1’i aktive ederek inflamasyonu başlatmaktadır. B: LPS ve antiinflamatuvar sitokinlerin pyrini tetiklemesi sonucu pyrin ASC’ye bağlanarak ASC’nin diğer bağlantılarını baskılar ve IL-1 işlev yapamaz.**

Apoptosis speck proteininin aktif rol aldığı nötrofillerde, ASC pyrin ile bağlanır ve indüklenmiş apoptozisi modüle eder. ASC tek başına ya da moleküler bileşiklerle, birbirleriyle ilişkili bulunan CARD-CARD etkileşimleri sayesinde kaspaz-1'in inaktivasyonuna neden olarak pro-inflamatuar oto katalizi indüklemektedir (41). Yapılan çalışmalarda inflamasyonun olduğu bölgelerde bulunan nötrofillerde ASC ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Apoptosis speck proteini aktivasyonu Fas ligandı ile artarken, Fas aracılı indüksiyonun kaspaz inhibitörü ile inhibe edildiği saptanmıştır. Fas ligandı, tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinin trans membran ailesine üye bir ligand/reseptördür. Kendi reseptörüne bağlanarak apoptozisi indükleyici etkisi vardır (42, 43).

Pyrin proteini şematik görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 7) (44).



Şekil 7. Pyrin proteini şematik görüntüsü (44)

## OTOİNFLAMATUAR HASTALIK

Otoinflamatuvar hastalıklar, inflamasyon ataklarıyla karakterize olan hem kalıtsal hem de multifaktöryel bozuklukları içeren hastalıklar grubudur. Bu hastalıklar daha önce kalıtsal ateş sendromları olarak isimlendirilmiş ancak her atak sonucu ateşin oluşmadığının gözlenmesi sonucunda bu terminoloji “otoinflamatuvar hastalıklar” olarak değiştirilmiştir (45, 46).

Otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıklar birbirine benzer klinik özellikler gösterebilirler de otoimmün hastalıklarda rastlanan antijene özgü T hücreleri ve otoantikörlere otoinflamatuvar hastalıklarda rastlanmamaktadır. Otoimmün hastalıklar sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi ile ilgili sorunlardan kaynaklanırken otoinflamatuvar hastalıklar doğal bağışıklık sistemi ile ilişkilidir (46).

Otoinflamatuvar hastalıkların oluşum mekanizması, apoptozis sürecine girmesi beklenen lökositlerin, mutasyon sonucunda pyrin proteininde meydana gelen değişiklikler sonucu yaşamaya devam etmesi ve bunun sonucunda çok hafif bir etkileşimde bile şiddetli inflamasyon ortaya çıkarmasına dayanmaktadır. Ayrıca sitokin salınımı sırasında ortaya çıkan

problemler de apoptozis mekanizmasının bozulmasına sebep olarak nötrofillerin sürekli etkin halde kalmasına ve böylece inflamasyon oluşumuna yol açmaktadırlar (46).

Nötrofiller, inflamasyon oluşumu sırasında görev alırlar. Otoinflamatuvar hastalıklarda nötrofillerin kan ve dokulardaki sayılarında ciddi bir artış gözlenir. Kalıtsal periyodik hastalıklarda ataklar sırasında kandaki nötrofil miktarı artar, ancak atak sonrası bu sayı yine normale döner.

Pyrin proteininin PYD domaini ile ASC proteinin PYD domaini birbirine bağlanarak kompleks bir yapı oluştururlar. Bu birleşme sonucunda ASC proteinin, CARD domaininin prokaspaz-1'e bağlanarak kaspaz-1'in inaktive ettiği düşünülmektedir. Pyrin proteininde meydana gelen mutasyonlar sonucu bu inaktivasyonun azalması veya tamamen ortadan kalkması sonucu kaspaz-1'in aktif hale gelmesiyle İnterlökin-1 alfa ve apoptozis yolağı uyarılır. Bu uyarılma sonucu sürekli inflamasyon oluşumu ve böylece otoinflamuar atakların meydana geldiği düşünülmektedir (47).

#### **Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) ve MEFV geni ilişkilendirilmesi**

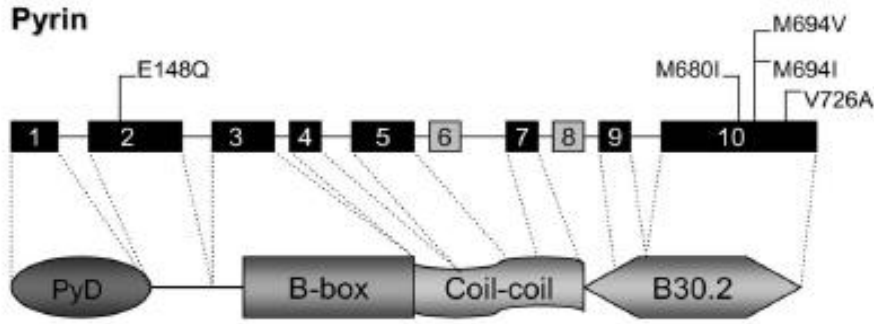
Ailesel akdeniz ateşi, özellikle Arap, Ermeni ve Türk populasyonunda görülen ve kalıtsal olarak otozomal resesif etki gösteren otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA; karın ağrısı, eklem ağrısı ve tekrarlayan ateş şeklinde klinik komplikasyonlar göstermektedir. AAA'nın iki fenotipi vardır: Tip 1 ve tip 2 (35, 36).

Ailesel akdeniz ateşi tip 1; ateş, peritonit, sinovit, plörezi, nadiren perikardit ve menenjit inflamasyon tekrarlayan kısa atakları ile karakterizedir. Belirtileri ve şiddeti her bireyde farklıdır, hatta bazen aynı ailenin üyelerinden etkilenen bireyler arasında bile farklılık gösterir. Ailesel akdeniz ateşi tip 2'nin ilk klinik belirtisi amiloidoz görülmesidir (48).

Ailesel akdeniz ateşi hastalığı, MEFV adı verilen gen tarafından kodlanan Pyrin proteinindeki hatalar sonucu ortaya çıkmaktadır. İnflamatuvar yolakta görevli olan Pyrin'in işlevi tam olarak bilinmese de yapılan çalışmalar sonucu inflamasyonu baskılayıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir (48).

Ailesel akdeniz ateşinde en sık görülen 4 mutasyon olan M680I, M694I, M694V ve V726A yanlış anlamlı mutasyonları (missense mutasyon) pyrin proteininin karboksi terminal bölgesinde yer almaktadır (Şekil 8). Vakaların büyük bir kısmında etnik köken önemsenmeksizin bu mutasyonların sorumlu olduğu belirtilmiştir (39). Belirtilen bu 4 yanlış anlamlı mutasyon genin 10. ekzonundadır ve bu ekzon mutasyonlar için hassas bir bölgedir.

Frekans bazında değerlendirildiğinde, 10. ekzondaki bu 4 mutasyon, MEFV geninde rastlanan AAA ile ilişkili mutasyonların %85'ini oluşturur (49).



**Şekil 8. MEFV mutasyonlarının pirin proteininde karşılık geldiği yerler (50)**

Ailesel akdeniz ateşi hastalarının birçoğunda MEFV geninde mutasyonlar mevcuttur. Granülositler, monositler, dendritik hücreler ile sinovial, peritonal, cilt kökenli fibroblastlarda eksprese olan 781 aminoasitlik pirin proteinin, interleukin-1 $\beta$  regülasyonu, NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve apoptoz mekanizmalarının aktivasyonu ile doğal bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir. Bugüne kadar yetmişden fazla AAA ile ilişkili pirin mutasyonu rapor edilmiştir (51). Bu genetik varyasyonların neredeyse tamamı korunumlu yanlış anlamlı mutasyonlardır ve patojenik mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır.

Mutasyonların birçoğu, B30.2 karboksil ucunu kodlayan ekzon 10 ya da PRY-SPRY domaininde meydana gelir. Son zamanlarda keşfedilen SPRY yapısına göre, en azından bazı mutasyonlar  $\beta$ -sandwich yapısıyla eşleşmektedir; böylece kaspaz-1 ile olan etkileşimde olduğu gibi protein-protein etkileşimlerine zarar veren bir SPRY-domaini ortaya çıkmaktadır (52, 53).

Mediterranean fever geninin karboksil ucunun hedefe yönelik kesilmesiyle elde edilen pirin proteinini hipomorfik olarak eksprese eden fare modellerinde yapılan bir çalışmada, homozigot mutant farelerin bakteriyel lipopolisakkaritlere (LPS) aşırı duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Aynı batında doğan farelerin karşılaştırılmasında ise, LPS ve IL-4 ile uyarılma sonucu, mutant farelerin makrofajlarındaki pirin ekspresyonu, yabancıl tip farelerinkine oranla çok daha düşüktür. Ayrıca, atak geçirmedikleri dönemlerde, AAA hastalarının periferik kanından elde edilen lökositlerdeki MEFV mRNA ekspresyonu ile sağlıklı kontrollerin periferik kanından elde edilen lökositlerdeki MEFV mRNA ekspresyonu karşılaştırıldığında, FMF hastalarında ekspresyonun daha düşük olduğu rapor edilmiştir (39).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **GEREÇLER**

#### **Etik Kurul Onayı**

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul tarafından, araştırmanın amacı, gerekçesi, gereç ve yöntemler ile gönüllü bilgi metni incelendikten sonra Bilimsel Araştırma Değerlendirme Komisyonu tarafından 08.06.2011 tarihinde 12/15 karar numarası ve sayılı belge (TÜBADK 2011/129) ile onaylanmıştır (Ek 1).

#### **Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu**

Çalışmamızdaki olgulara araştırmanın içeriğini anlatan, kişilere uygulanacak işlemler hakkında bilgi veren, “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” kullanıldı. Hasta ve kontrol grubu olgularının her birinden uygulanacak işlemler için onay alınmıştır (Ek 2).

#### **Hasta Grubu**

Çalışmaya Eylül 2011- Ağustos 2012 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniği’ne başvuran Uluslararası Çalışma Grubunun tanı kriterlerine göre yeni AS tanısı konmuş veya AS tanısı konmuş ve tedavisi devam eden hastalar dahil edilmiştir.

Hasta grubu, Trakya Bölgesi’nde yaşayan, herhangi oto-inflamatuvar bir hastalığı olmayan ve birbirleri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan 14 kadın ve 36 erkek HLA-B\*27 (+)

50 AS hastası, 11 kadın ve 19 erkek HLA-B\*27 (-) 30 AS hastası olmak üzere toplam 80 kişiden oluşmaktadır.

Hasta grubu özellikleri;

- 18 yaşından gün almış olmak,
- Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,
- Herhangi bir bağışıklık sistemi hastalığı tanısı almamış olmak,
- Hamile olmamak,
- HLA-B\*27 pozitif ve HLA-B\*27 negatif klinik tanı kriterlerine göre AS tanısı almış olmak.

### **Kontrol Grubu**

Kontrol grubuna Trakya Bölgesi'nde yaşayan, 18 yaşından büyük, herhangi bir oto-inflamatuar hastalığı olmayan, HLA-B\*27 (-), 17 kadın ve 33 erkek birey olmak üzere toplam 50 kişi dahil edildi.

Çalışmaya dahil olan hasta ve kontrol grubundaki tüm bireylere çalışma hakkında bilgi içeren ve onayının alındığını belgeleyen "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatıldı.

Kontrol grubu özellikleri;

- 18 yaşından gün almış olmak,
- Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,
- Herhangi bir bağışıklık sistemi hastalığı tanısı almamış olmak,
- Hamile olmamak
- HLA-B\*27 negatif olmak, klinik tanı kriterlerine göre AS tanısı konmamış olmak

### **Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler**

Kullanılan cihazlar

- PCR (GeneAmp PCR Sistem 9700)
- Otomatize DNA izolasyon cihazı (Qiagen)
- Sekans cihazı (Pyromark, Qiagen)
- Vorteks (Yellow Line)
- Isıtıcı (VWS)
- Santrifüj (Heraeus)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Yatay Elektroforez Sistemleri (Thermo Scientific)



- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)
- Hassas terazi (Scaltec SPB 31)
- Buzdolapları: (-) 20 °C derin dondurucu (Arçelik), (+) 4 °C soğutucu (İndesit)
- FMF Mutasyon Tarama Kiti (Pyromark)

#### **Sarf Malzemeler:**

- DNA izolasyon kiti (Qiagen)
- Olerup SSP HLA-B\*27 kit
- DNA Taq Polimeraz 5 u/μl, (Fermentas)
- Agaroz
- 10xTBE buffer, Liquid, 500 ml, Multicell
- Etidium bromid: 10mg/ml, Biomatik,
- Agaroz jel yükleme tampon
- Pyrosequencing FMF Primer kiti (Qiagen)

## **YÖNTEMLER**

### **Periferik Venöz Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen kişilerin periferik venlerinden 4 cc venöz kan EDTA'lı tüplere alındı ve DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole uygun olarak DNA'lar otomatik DNA izolasyon cihazı ile izole edildi. Analiz zamanına kadar örnekler -20 C°'de muhafaza edildi.

### **Genomik DNA'ların Spektrofotometrik Ölçümleri**

Genomik DNA'lar NanoDrop ile 260-280 nm dalga boylarında ölçüldü, dalga boyu 120-50ng arasında olan genomik DNA örnekleri çalışmaya dahil edildi.

### **HLA-B\*27 Testi**

Bu çalışmada hastalardan ve kontrol grubundan elde edilen DNA'lardan ilk aşamada Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) yöntemi ile HLA-B\*27 alellerine bakıldı. HLA-B\*27 genotiplendirmesinde düşük rezolüsyonlu Olerup SSP kiti kullanıldı. Amplifikasyonda GeneAmp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems) kullanıldı. PCR-SSP yönteminde diziyeye özgü primerler ile amplifikasyon yapılarak 0.5'lik TBE ile % 2 agaroz jelde, 160 volt, 450 amp., 10 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra jel

elektroforezde yürütülen PCR ürünleri Score bilgisayar yazılım programında pozitif bantlar değerlendirildi (Şekil 9).

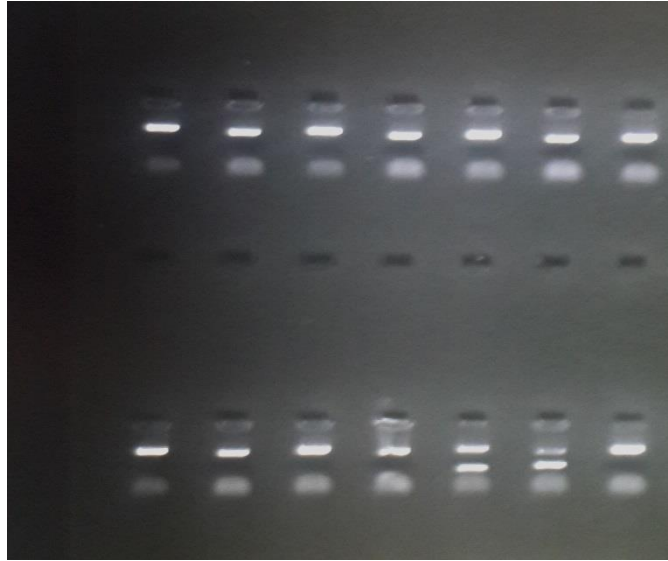
### PCR Programı

94°C'de 2 dak. 1 siklus

94°C'de 10 sn. }  
65°C'de 1 dak. } 10 siklus

94°C'de 10 sn. }  
61°C'de 50 sn. } 20 siklus  
72°C'de 30 sn. }

(+) 4°C'de sonsuz



**Şekil 9. PCR-SSP yöntemi jel görüntüsü. Alt sırada en sonda yer alan iki kuyucuktan çift bantlı olan HLA-B\*27 pozitif kontrol ve en sonda yer alan tek bant HLA-B\*27 negatif kontrol'dur.**

### Mediterranean Fever Gen Mutasyon Analizi

Mediterranean fever gen mutasyonlarının tespiti amacı ile Pyrosekans yöntemi kullanılmıştır. Pyrosekans yöntemi iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada çoğaltılmak istenen gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilir. İkinci aşamada amplifiye edilen gen

bölgelerine özgü sentetik oligonükleotidler (primerler) kullanılarak verilen protokola uygun pyrosekans tekniği uygulanır.

Mutasyon analizinde Pyrosequencing FMF Primer kiti (Qiagen) kullanıldı. FMF kiti ile ekzon 2, 3, 5 ve 10 bölgeleri analiz edildi.

FMF Pyrosequencing Testi ile hastalarda ve kontrol grubunda sırasıyla ile E148Q, P369S, H478Y, F479L, S675N, G678E, M680I (G>C), M680I (G>A), M680L, T681I, I692del, M694V, M694I, M694L, K695R, K695M, R717S, I720M, V722M, V726A, A744S, ve R761H mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmiştir. Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı Tablo 5’de gösterilmiştir.

### **Pyrosequencing Çalışma Prensibi**

FMF Pyrosequencing Testi ile örnek başına 8’li PCR stripi kullanılarak PCR yapılır. PCR reaksiyonundan sonra örnek başına sekiz pyrosequencing reaksiyonu uygulanır.

Okunan diziler protokolde verilen tespit edilmiş mutasyonlarla karşılaştırılarak hastada var olan mutasyonlar saptanır. Analiz işlemi sırasında elde edilen veriler Ek-3’te verilen diziler ile karşılaştırılır.

### **FMF Pyrosequencing kiti çalışma prosedürü**

#### **1. Basamak: PCR**

- 1) Bir stripin 8 tüpüne konsantrasyonu yaklaşık 2 ng/µl’ye ayarlanmış DNA örneğinden 5’er µl eklenir.
- 2) Reaksiyon Tablo 3’teki protokole göre uygulanır.

**Tablo 3. PCR protokolü**

<b>Aktivasyon basamağı</b>	95°C	15 dakika
<b>3 aşamalı döngü:</b>		
Denaturation	94°C	30 saniye
Annealing	60°C	30 saniye
Extension	72°C	30 saniye
<b>Döngü sayısı: 45</b>		
Final extension	72°C	10 dakika

## 2. Basamak: Pyrosequencing

- 1) Streptavidin Sepharose bilyelerini içeren tüp nazik bir şekilde çalkalanarak homojen bir solüsyon elde edilir.
- 2) Tablo 4’te gösterildiği şekilde bir mastermix hazırlanır.

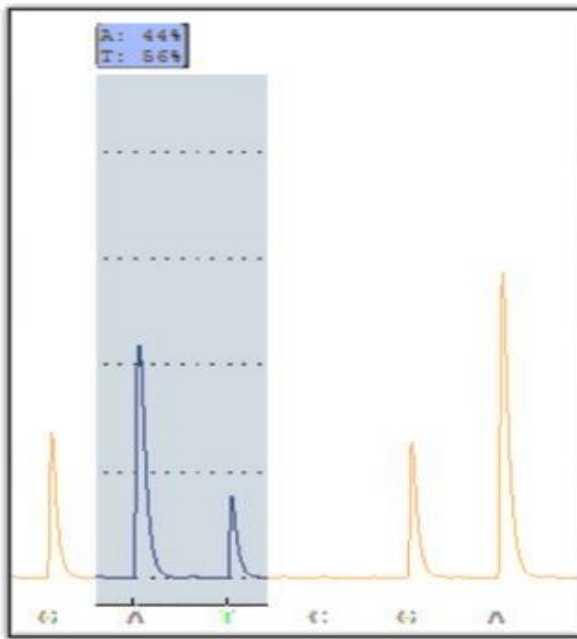
**Tablo 4. Mastermix içeriği**

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar/örnek</b>	<b>24 örnek için</b>
Streptavidin Sepharose bilyeler	2 µl	2 x 26 = 52 µl
Binding Buffer	40 µl	40 x 26 = 1040 µl
Ultrapure H <sub>2</sub> O	28 µl	28 x 26 = 728 µl
<b>Toplam</b>	<b>70 µl</b>	

- 3) 24 kuyucuklu PCR plate’i veya strip kullanarak her bir kuyucuğa 70 µl mastermix konulur.
  - 4) Her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürününü eklenir. Her bir 8’li sıra bir hastaya ayrılmıştır ve bu sıra PCR stripi ile aynı sıradadır.
  - 5) PCR plate’inin veya striplerin kapağını sızdırma olmayacak şekilde kapatılır.
  - 6) Plate veya stripleri birkaç kere ters-yüz ettikten sonra çalkalayıcıya konulur ve oda sıcaklığında 1400 rpm’de 10 dakika çalkalanır.
  - 7) Q24 Plate’in her bir kuyucuğuna 2.5 µl sekans primeri ve 22.5 µl annealing buffer eklenir.
  - 8) PCR plate veya striplerini ve Q24 plate’i aynı oriyantasyonda olmasına dikkat ederek vakum çalışma alanında ilgili yerlere yerleştirilir.
  - 9) Vakum pompasının düğmesini ve el ünitesinin üstündeki vakum anahtarını açılır.
  - 10) Filtre problemlerini PCR plate’in veya striplerin dikkatlice üstüne getirerek tüplerin içine daldırılır ve 15 saniye kadar tutarak bilyeleri yakalaması sağlanır.
- (\*) Sepharose bilyeler çok çabuk çöktüğünden PCR plate veya striplerin çalkalanması bittikten sonraki 1 dakika içerisinde yapılmalıdır.
- 11) El ünitesini % 70 etanol kabına daldırarak 5 saniye bekletilir.
  - 12) El ünitesini sırasıyla “Denaturation Solution” içeren kaba daldırarak 5 saniye, Washing Buffer” içeren kaba daldırarak 10 saniye bekletilir.

- 13) El ünitesini dikey biçimde 90°'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlar.
- 14) El ünitesini Q24 plate üzerine getirip orda tutarak ünitenin üstündeki vakum anahtarını ve vakum pompasının düğmesini kapatılır.
- 15) El ünitesinin problemlerini Q24 plate kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeleri sekans primerini içeren buffer'a bırakılır.
- 16) El ünitesini su içeren kaba daldırarak 10 saniye çalkalanır.
- 17) El ünitesini dikey biçimde 90°'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutarak filtre problemlerinden sıvının uzaklaştırılmasını sağlar.
- 18) Q24 plate'i önceden 80°C'ye getirilmiş plate holder üzerine koyarak 80°C'de 2 dakika bekletilir.
- 19) Q24 plate'i plate holder üzerinden kaldırarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.
- 20) Pre Run information report'da yazan miktarlardaki nükleotitler, enzim ve substratı kartuşa konulur.
- 21) Kartuş cihazda yuvasına dikkatli bir şekilde konulur. Yerine yerleştirilir
- 22) Önceden hazırlanan Run dosyası USB'ye yüklenir ve cihaza takılır. Cihaz çalıştırılır
- 23) Çalışma bittikten sonra ve cihaz analiz dosyasının USB'ye kaydedilir, bilgisayarda analizi yapılır.

Analiz sonucunda Şekil 10'daki gibi grafik elde edilir ve mutasyonların karşılaştırılması yapılır.



Şekil 10. FMF Pyrosequencing analiz değerlendirme için örnek grafik

Pyrosekans, DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfat'ların belirlenmesi esasına dayanan bir real-time kantitatif dizi analizi tekniğidir. İşlem PCR ürünlerinin tek zincir DNA (ssDNA) ya dönüşmesi ile başlar. Tek sarmal DNA kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir, her bir primer çifti biotin ile 5' ucundan işaretlenir. Açığa çıkan pirofosfat; ATP sülfürylase yardımı ile ATP'ye çevrilir. Ortamda oluşan ATP' nin yardımı ile lüsiferin, oksilüsiferin'e dönüşür. Oksilüsiferin, görünür bir ışın açığa çıkarır. Ortaya çıkan bu ışın miktarı ATP miktarı ile orantılıdır. Oluşan ışın CCD (kıızıl ötesi) kamera ile tespit edilir ve seri tepecik şeklinde kaydedilir. Işın ekranda bir yükseklik veya tepecik şeklinde gözlemlenir. Her bir tepeciğin yüksekliği eklenmiş olan nükleotid sayısı ile doğru orantılıdır.

Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5. Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı**

No	Mutasyon	Ekzon
1	E148Q	2
2	P369S	3
3	H478Y	5
4	F479L	5
5	S675N	10
6	G678E	10
7	M680I (G>C)	10
8	M680I (G>A)	10
9	M680L	10
10	T681I	10
11	I692del	10
12	M694V	10
13	M694I	10
14	M694L	10
15	K695R	10
16	K695M	10
17	R717S	10
18	I720M	10
19	V722M	10
20	V726A	10
21	A744S	10
22	R761H	10

## BULGULAR

### Çalışma Grubu

Çalışma grubu, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarına gönderilen 130 kişiden oluşturuldu. Hasta grubu Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi Ve Rehabilitasyon bölümünden AS tanısı konmuş 80 kişi, kontrol grubu ise sağlıklı 50 kişi olarak belirlenmiştir.

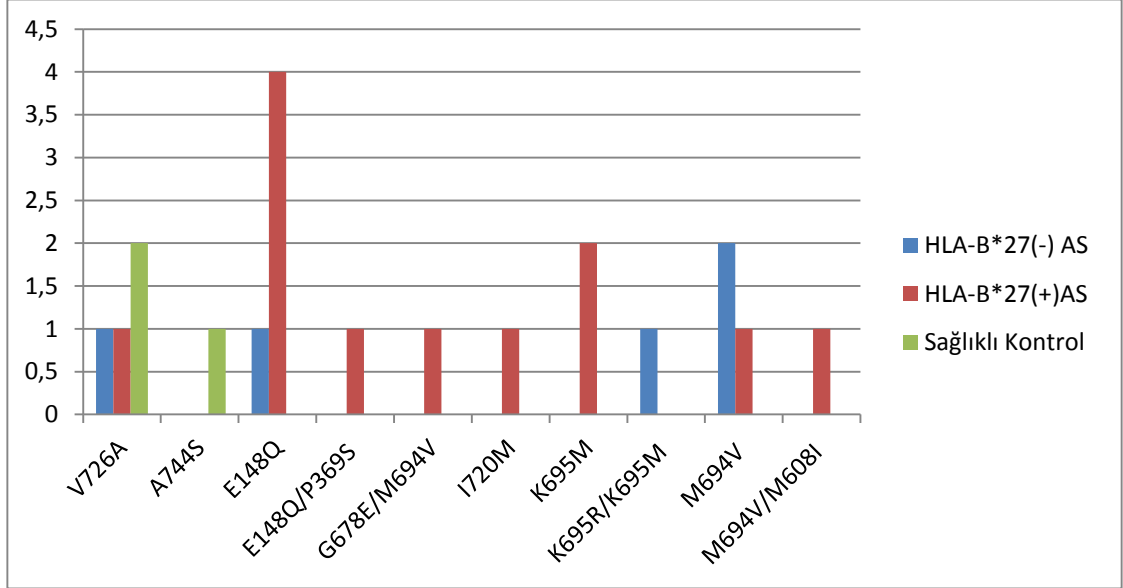
Yapılan mutasyon analizleri sonucunda HLA-B\*27(+) AS olup MEFV mutasyonu taşıyan 12 hasta, HLA-B\*27(-) AS olup MEFV mutasyonu taşıyan 5 hasta ve sağlıklı olup MEFV mutasyonu taşıyan 3 kişi tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundaki mutasyonların dağılımı aşağıda Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6. Hasta grubu ve mediterranean fever geni mutasyonlarının dağılımı**

Genotip	HLA-B*27(-) AS	HLA-B*27(+) AS	Sağlıklı Kontrol
V726A	1	1	2
A744S	-	-	1
E148Q	1	4	-
E148Q/P369S	-	1	-
G678E/M694V	-	1	-
I720M	-	1	-
K695M	-	2	-
K695R/K695M	1	-	-
M694V	2	1	-
M694V/M608I	-	1	-

Hasta gruplarında tespit edilen mutasyonlar karşılaştırıldığında, HLA-B\*27 (+)/(-) olduğu gözlemlenirken 80 hastadan 17'sinde MEFV mutasyonu saptanmıştır. 17 kişiden 4'ün de iki farklı heterozigot mutasyon vardır.

Aşağıdaki şekilde MEFV mutasyonlarının AS hastalarının gruplandırılmasına göre dağılımı gösterilmiştir (Şekil 11).



**Şekil 11. Ankilozan spondilit hastalarında tespit edilen mediterranean fever geni mutasyonlarının dağılımları**



HLA-B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 ve ekzon 10 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(+) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak yüksek saptandı ( $p=0,012$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7. HLA B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 ve Ex.10 mutasyonları genotip frekansları**

	MEFV Ex. 2 ve Ex. 10 Mutasyonu		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Pozitif	38(76%)	12(24%)	50(100%)
Kontrol Grubu	47(94%)	3(6%)	50(100%)
<i>p</i>	0,012		

HLA-B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 ve ekzon 10 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(-) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı ( $p=0,124$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8. HLA B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 ve Ex.10 mutasyonları genotip frekansları**

	MEFV		Total n(%)
	Mutasyon(-) n (%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif	25(83,3%)	5(16,7%)	30(100%)
Kontrol Grubu	47(94%)	3(6%)	50(100%)
<i>p</i>	0,124		

HLA-B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 10 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(+) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı ( $p=0,182$ ) (Tablo 9).

**Tablo 9. HLA B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.10 mutasyonları genotip frekansları**

	MEFV Ex.10		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Pozitif	43(86%)	7(14%)	50(100%)
Kontrol Grubu	47(94%)	3(6%)	50(100%)
<i>p</i>	0,182		

HLA-B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(+) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak yüksek ( $p=0,022$ ) saptandı (Tablo 10).

**Tablo 10. HLA B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 mutasyonları genotip frekansları**

	MEFV Ex.2		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu	45(90%)	5(10%)	50(100%)
% HLA B27 Pozitif			
Kontrol Grubu	50(100%)	0(0%)	50(100%)
<i>p</i>	0,022		

HLA-B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 10 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(-) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna gore MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı ( $p=0,261$ ) (Tablo 11).

**Tablo 11. HLA B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV geni Ex.10 mutasyonu genotip frekansları**

	MEFV Ex. 10		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif	26(86,7%)	4(13,3%)	30(100%)
Kontrol Grubu Kontrol	47(94%)	3(6%)	50(100%)
<i>p</i>	0,261		

HLA-B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve HLA-B\*27(-) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $p=0,194$ ) (Tablo 12).

**Tablo 12. HLA B\*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV geni Ex.2 mutasyonu genotip frekansları**

	MEFV Ex. 2		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif	29(96,7%)	1(3,3%)	30(100%)
Kontrol Grubu	50(100%)	0(0%)	50(100%)
<i>p</i>	0,194		

HLA-B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 ve ekzon 10 mutasyonları açısından karşılaştırıldı ve AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak yüksek saptandı ( $p=0,019$ ) (Tablo 13).

**Tablo 13. HLA B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV (Ex. 2 ve Ex. 10) Mutasyonlarının genotip frekansları**

	MEFV Ex. 2 ve Ex. 10 Mutasyonu		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif ve Pozitif	63(78,8%)	17(21,3%)	80(100%)
Kontrol Grubu	47(94%)	3(6%)	50(100%)
<i>p</i>	0,19		

HLA-B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu M694V MEFV geni mutasyonu açısından karşılaştırıldı ve AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $p=0,071$ ) (Tablo 14).

**Tablo 14. HLA B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan M694V mutasyonlarının genotip frekansları**

	MEFV Ex. 2 ve Ex. 10 Mutasyonu		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif ve Pozitif	75(93,8%)	5(6,3%)	80(100%)
Kontrol Grubu	50(100%)	0(0%)	50(100%)
<i>p</i>	0,71		

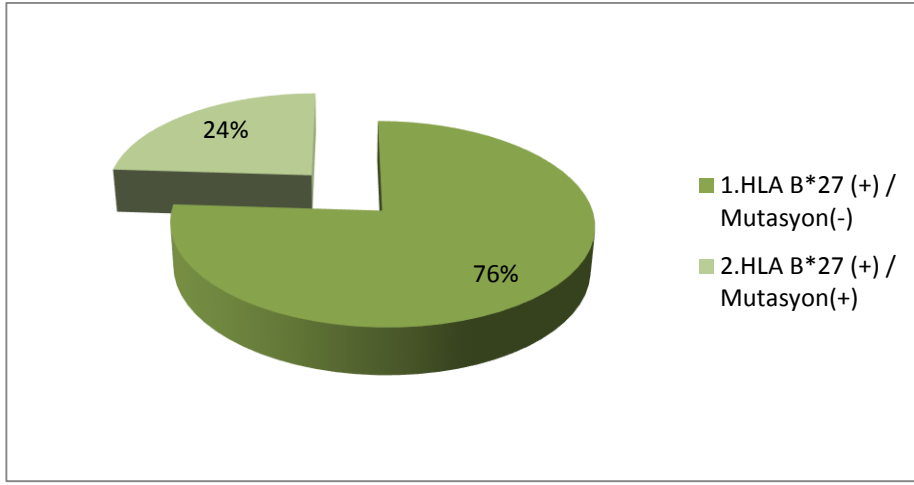


HLA-B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu E148Q MEFV mutasyonu açısından karşılaştırıldı ve AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p=0,47$ ) (Tablo 15).

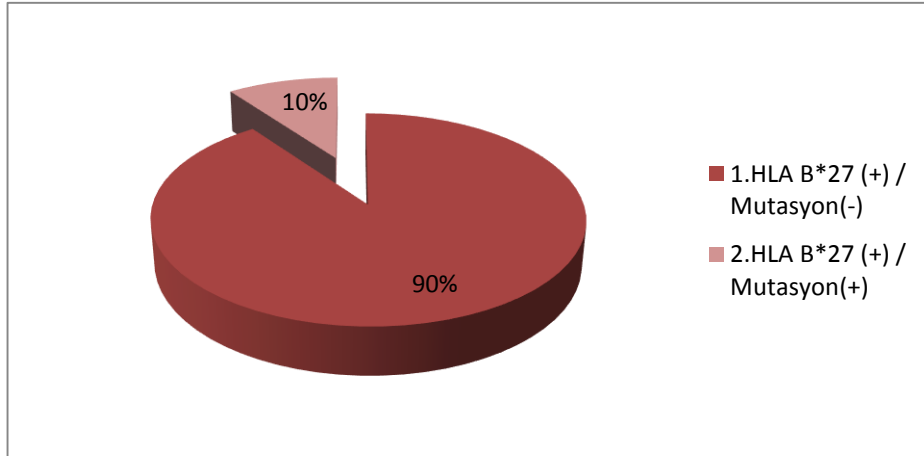
**Tablo 15. HLA B\*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan E148Q mutasyonlarının genotip frekansları**

	MEFV Ex. 2 ve Ex. 10 Mutasyonu		Total n(%)
	Mutasyon(-) n(%)	Mutasyon(+) n(%)	
Hasta Grubu HLA B27 Negatif ve Pozitif	74(92,5%)	6(7,5%)	80(100%)
Kontrol Grubu	50(100%)	0(0%)	50(100%)
<i>p</i>	0,81		

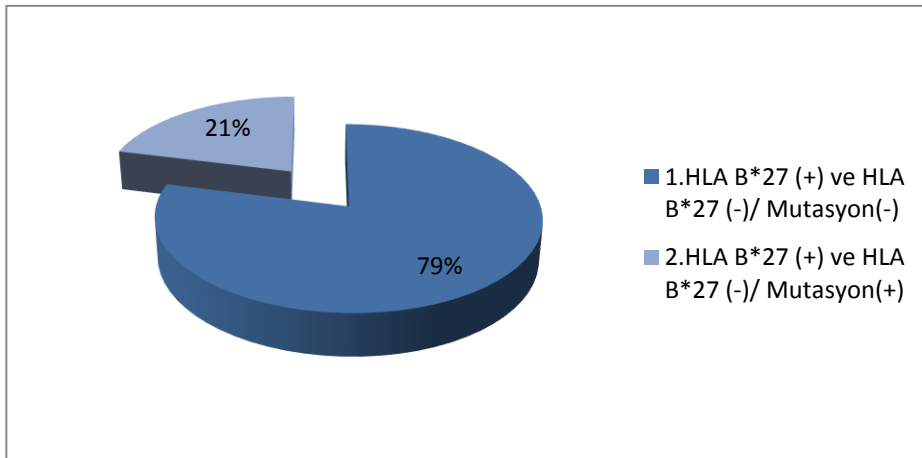
Mutasyonların yüzdelik dağılımı grafik şeklinde aşağıda verilmiştir (Şekil 12-16).



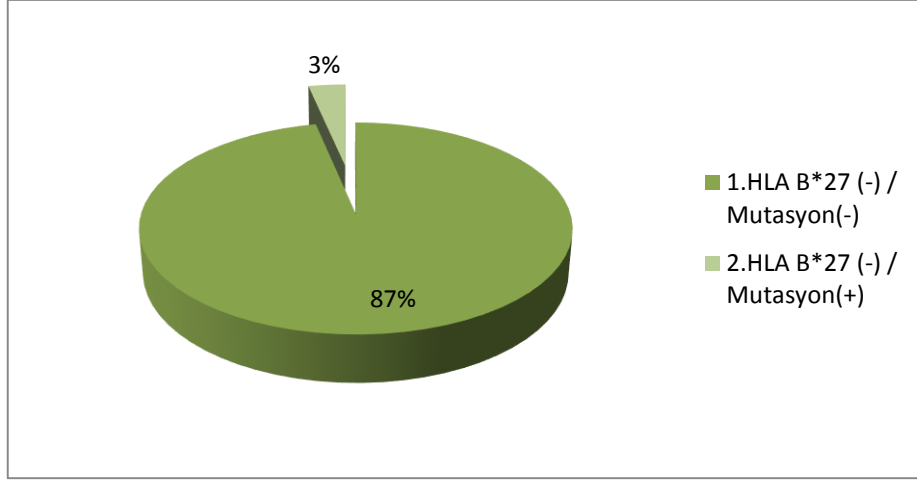
**Şekil 12. HLA B\*27(+)** AS hastalarında ekzon 10 mutasyon karşılaştırması



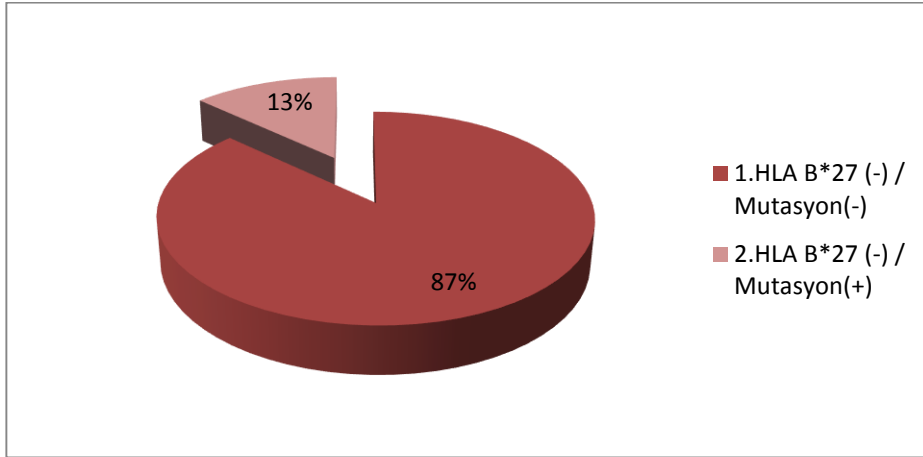
**Şekil 13.HLA B\*27(+)** AS hastalarında ekzon 2 mutasyon karşılaştırması



**Şekil 14. HLA B\*27(+)** ve (-) AS hastalarda MEFV gen (Ekzon 2 ve 10) mutasyon karşılaştırması



**Şekil 15. HLA B\*27(-) AS hastalarında ekzon 10 mutasyon karşılaştırması**



**Şekil 16. HLA B\*27(-) AS hastalarında ekzon 2 mutasyon karşılaştırması**

## TARTIŞMA

Ankilozan Spondilit, etiyojisi bilinmeyen, kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. Türkiye’de görölme sıklığı % 0,49’dur (54). AS klinik, epidemiyolojik ve genetik özellikleri bakımından Seronegatif Spondilartropati hastalık grubuna dahildir (Tablo 16) (55).

**Tablo 16. Seronegatif spondilartropatilerin ortak özellikleri**

- Spinal eklem tutulumu ile sakroiliit ve spondilit oluşumu
- Periferel artrit oligoartiküler ve simetrik olması
- Tendon ve ligamentlerin bağlanma yerlerinde inflamasyon olması
- Genellikle genç yaşta başlaması
- Romatoid faktör testlerinin negatif olması
- Ailesel predispozisyon olması ve HLA-B27 ilişkisi

MEFV geni, 3505 nükleotid ve 10 ekzondan oluşmaktadır. 781 aminoasitten oluşan, arjinin ve lizin aminoasitleri bakımından zengin bir protein olan pypin proteinini kodlamaktadır (56). MEFV geni üzerinde bugüne kadar yetmişin üzerinde mutasyon saptanmıştır ancak hastalara AAA için tanı konulurken en sık rastlanan mutasyonlara bakılmaktadır. MEFV geninin 10.ekzonunda bulunan dört tane (M680I, M694I, M694V, V726A) ve 2.ekzon üzerinde bulunan bir tane (E148Q) mutasyon AAA hastalığının sık görüldüğü toplumlardaki mutasyonların % 85'ini kapsamaktadır (57). Çoğunlukla Ermenilerde ve Araplarda görülen AAA, oto- inflamatuvar bir hastalıktır. AS ve FMF

hastalıklarının Türkiye’de görülme olasılıkları yüksek olduğundan, birlikte görülme olasılıkları da yüksektir. Buna rağmen her iki hastalığın birlikte görüldüğü az sayıda literatürde yer almaktadır (58).

Akkoç ve ark.’ları (2010) tarafından 62 AS hastası, 50 sağlıklı kontrol ve 46 Romotaid Artrit (RA) hastasını MEFV mutasyonları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda AS grubunda mutasyon oranında kontrol grubuna göre artış saptanmıştır. Bunun sebebinin M694V mutasyon taşıyıcılığından kaynaklı olduğu belirtilmiştir. ( $p=0,026$ ) AS’li hastalar ile sağlıklı kontrol) ( $p=0,046$ ) AS’li hastalar ile RA’lı hastalar) ( $p=0,008$ ) AS’li hastalar ile sağlıklı kontrol ve RA’lı hastalar) (58).

Coşan ve ark.’ları (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 193 AS hastası ve 103 sağlıklı kontrol grubunda MEFV gen mutasyonlarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, AS hastalarında HLA-B\*27(-) grupta HLA-B\*27(+)gruba göre E148Q MEFV mutasyonunun arttığı belirtilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ekzon 10 mutasyonlarındaki artış AS hastalarında HLA-B\*27(-) grupta HLA-B\*27(+) gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm MEFV mutasyonları AS ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AS grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre FMF prevalansı fazla olan toplumlarda bulunan AS hastalarında görülen mutasyon sıklığının artış göstermesi gerektiği belirtilmiş ve çalışmanın hasta sayısının fazlaştırılarak çalışılması gerektiğini vurgulamışlardır (59).

Durmuş ve ark.’nın (2009) yapmış olduğu çalışmada 80 AS hastası ve 85 sağlıklı bireyde strip-assay tekniği ile 12 mutasyon araştırılmıştır. 24 AS hastası ve 17 sağlıklı bireyde MEFV gen mutasyonu tespit edilmiştir. AS hastalarında MEFV gen mutasyonu taşıma oranı, sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak yüksek bulunmamıştır ( $p=0,13$ ) (60). Ancak MEVF mutasyonuna sahip AS hastalarında klinik seyrin ağırlaştığı tespit edilmiştir.

Kastbom ve ark.’larının (2013) çalışmasında HLA-B\*27 antijeni olmaksızın New York kriterlerine uygun 492 hastada üç NLRP3 SNPs (rs35829419, rs4353135, and rs10733113) ve bir CARD8 (rs2043211) SNP analizi TaqMan assays metodu ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar 793 sağlıklı birey ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre İsveç popülasyonunda CARD8-C10X minör aleli olan hastalarda AS riskinin arttığı belirtilmiştir ( $p=0,012$ ) (61) .

Ölüm domaini grubuna ait CARD proteinleri apoptosis ve inflamasyon proteinlerinin yapısında yer alarak protein-protein etkileşimini sağlamaktadırlar. CARD, Pyrin proteininin yapısında yer alan bir domainidir. Pyrinde meydana gelen mutasyonlar sürekli kaspas

salınımına neden olur ve inflamasyona yol açar. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada HLA B\*27(+) ve (-) sınıflandırma gözetilmeksizin bakıldığında AS hastalarında MEFV mutasyonu görülme sıklığı anlamlı istatistiksel olarak ( $p=0,019$ ) anlamlı bulundu. Bu demek oluyor ki AS hastalarında MEFV gen mutasyonu taşıma oranı yüksektir. Kastbom ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CARD8'de meydana gelen mutasyonların hastalarda AS riskini artırdığı belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada MEFV mutasyonu tespit edilen AS hastalarında CARD8 aleline bakılarak aralarında anlamlı bir ilişki olup olmadığına bakılabilir.

Yaptığımız çalışmada AS tanısı konmuş 80 kişi ile inflamatuvar bir hastalığı bulunmayan 50 sağlıklı birey incelendi. Çalışmaya dahil edilen AS tanısı konmuş 80 hasta; HLA B\*27(+) 50 ve HLA B\*27(-) 30 hasta olmak üzere iki ayrı grup olarak ele alınmıştır. Çalışmamızda AS grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında yapılan 22 MEFV mutasyon taraması sonucu anlamlı bulunmuştur ( $p=0,019$ ) (Tablo 13 ). 30 HLA-B\*27(-) AS hastası ile kontrol grubu arasındaki MEFV mutasyonları incelendiğinde hasta sayımızın azlığından ötürü anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Coşan ve ark.'larının çalışmasının sonucuna göre ise HLA B\*27(-) AS hasta grubunda MEFV mutasyonu görülme sıklığı fazladır.

HLA B\*27(+) AS hasta grubu ekzon 10 mutasyon taraması sonucu sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç saptanmamakla beraber 80 AS hastasının 5'inde M694V mutasyonuna rastlanmıştır ( $p=0,071$ ) (Tablo14) (Şekil 13). Akkoç ve ark.'larının (2010) yapmış olduğu çalışmanın ise bu sonuç anlamlı bulunmuştur.

Yine yapmış olduğumuz çalışmaya göre AS hastalarında herhangi bir ayırım yapılmaksızın bakıldığında AS hastası olan kişilerde MEFV mutasyonu görülme olasılığı yüksektir (Tablo 13). HLA-B\*27(+) AS hastalarında ekzon 2'de en çok görülen mutasyon E148Q olarak saptanmıştır. Bu hastalarda ekzon 10'daki mutasyonlar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmaz iken (Tablo 9) ekzon 2 ile anlamlı bir ilişki saptanmasının nedeninin E148Q mutasyonu olabileceği düşünülmüştür (Tablo 10).

## SONUÇLAR

Ankilozan spondilit hastalığında MEFV gen mutasyonu araştırılması adına yayınlar mevcuttur. Ancak yayınların büyük bir çoğunluğunda belirli MEFV gen mutasyonlarına bakılmıştır. Bazılarında E148Q mutasyonu direk enzim kesimi ile tespit edilmiştir. Bu araştırmalar genişletilebilir.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 130 bireyin her birinde 22 mutasyon araştırılmıştır. Çalışmamızın avantajı HLA-B\*27 antijeni sınıflandırması yapılarak kıyaslamalar yapılmıştır. Bu sayede HLA-B\*27 antijeni taşıyan ve taşımayan AS hastaları arasında MEFV gen mutasyonu taşıma oranı bakımından farklılık olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamıza göre HLA-B\*27 antijeni taşıyan hastalarda ekzon 2 MEFV gen mutasyonu görülme riski yüksektir. Ayrıca antijen taşıyan ve taşımayan olarak ayırım yapılmaksızın MEFV gen mutasyonu taşıma oranına bakıldığında anlamlı ilişki elde edilmiştir (Tablo 17).

Ankilozan spondilit hastalarında ekzon 3 ve ekzon 5 mutasyonlarının da bakılmış olup istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

**Tablo 17. Kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki mutasyonların karşılaştırılması**

<b>Kontrol grubu ile karşılaştırılan hasta grubu</b>	<b>Ekzon 2 Mutasyonları</b>	<b>Ekzon10 Mutasyonlar</b>	<b>Tüm Mutasyonlar</b>
<b>B*27(+) Hastalar</b>	<b>Anlamlı</b>	Anlamsız	<b>Anlamlı</b>
<b>B*27(-) Hastalar</b>	Anlamsız	Anlamsız	Anlamsız
<b>Tüm Hastalar</b>	<b>Anlamlı</b>	Anlamsız	<b>Anlamlı</b>

Pyrin proteininde meydana gelen mutasyonlar inflamasyona sebep olmaktadır. AS, otoinflamatuar bir hastalıktır ve inflamatuara neyin sebep olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak; bu hipotezin doğrulanması için hasta ve kontrol grubunun birey sayısı artırılarak farklı populasyonlarda çalışılmasına ihtiyaç vardır. Diğer bir yandan CARD8 minor alelinin ve pyrin proteinin aktivasyon ve inaktivasyonundan sorumlu sinyal yollarının AS hastalarının üzerinde incelenmesi öngörüsündeyiz. Böylece daha anlamlı ve destekleyici sonuçlar elde edilecektir.



## ÖZET

Ankilozan Spondilit (AS), etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, inflamatuvar sırt-bel ağrısına neden olan, patogenezinde çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülen aksiyal sistemi tutan, entezitin yanı sıra eklem dış hatlarını içeren akut anterior üveitlerin oluşabildiği, cilt lezyonları ve bağırsak yangılarına neden olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır.

Çalışmamızda HLA-B\*27(+) ve B\*27(-) AS tanılı hastalarda MEFV gen mutasyonlarının araştırılmıştır. İlk aşamada hastalardan ve kontrol grubundan elde edilen DNA'lerden PCR-SSP yöntemi ile HLA-B\*27 alellerine bakılmıştır. İkinci aşamada, mutasyon analizinde Pyrosequencing yöntemi ile MEFV geninde ekzon 2, 3, 5 ve 10 bölgeleri analiz edilmiştir.

Hastalarda ve kontrol grubunda sırasıyla ile E148Q, P369S, H478Y, F479L, S675N, G678E, M680I (G>C), M680I (G>A), M680L, T681I, I692del, M694V, M694I, M694L, K695R, K695M, R717S, I720M, V722M, V726A, A744S, ve R761H mutasyonları heterozigot veya homozigot olarak belirlenmiştir

Çalışmamızda, HLA-B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2, 3, 5 ve 10 mutasyonları açısından karşılaştırılmıştır ve HLA-B\*27(+) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. HLA-B\*27(+) AS hasta grubu ile sağlık kontrol grubu MEFV geni ekzon 2 mutasyonları açısından karşılaştırılmıştır ve HLA-B\*27(+) AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre MEFV gen mutasyon frekansı istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. AS hasta grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekzon 2 mutasyon görülme

sıklığı, ekzon 10'a göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm hastalar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekzon 2 ve 10'da mutasyon görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

Sonuç olarak, hipotezin doğrulanması için daha yüksek sayıda hasta ve kontrol grubu oluşturulmalıdır. Çalışmaya dahil edilen kişilerin demografik özellikleri (yaş, ırk, hastalığın şiddeti gibi) incelenerek daha doğru veriler elde edilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Ailevi Akdeniz Ateşi, HLA B-27, Ankilozan spondilit, MEFV, Pyrin

# **INVESTIGATION OF MUTATIONS IN MEFV GENE AMONG HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN (HLA)-B\*27 POSITIVE AND B\*27 NEGATIVE IN ANKYLOSING SPONDYLITIS PATIENTS**

## **SUMMARY**

Ankylosing spondylitis, the etiology of which is unknown, is a chronic inflammatory disease which is inflammatory, the pathogenesis can be caused by environmental, immunologic, and genetic factors, causes back-low back pain; holds the axial system, causes acute anterior uveitis in counter-joint borders as well as enthesitis, also skin lesions and intestinal inflammation.

In the present study, we have investigated MEFV mutations of HLA-B\*27(+) and B\*27(-) patients with ankylosing spondylitis diagnosis. At the first step, genomic DNA isolation was performed using blood samples of patients and control group members. HLA-B\*27 positivity was decided via PCR-SSP method. At the second step of the study, MEFV mutations were analyzed via Pyrosequencing method using the DNA samples isolated at the first step. Exons 2, 3, 5 and 10 of MEFV gene were analyzed for mutations and the method was capable of detecting the mutations; E148Q, P369S, H478Y, F479L, S675N, G678E, M680I (G>C), M680I (G>A), M680L, T681I, I692del, M694V, M694I, M694L, K695R, K695M, R717S, I720M, V722M, V726A, A744S, and R761H.

In the present study, HLA-B \* 27(+) AS patients and healthy control group members were compared according to exon 2, 3, 5, and 10 mutations of MEFV gene and the differences of frequency of MEFV gene mutations were found statistically significant between the

groups. Besides, exon 2 mutation frequency were found statistically significant between the groups and higher in HLA-B\*27(+) study group than healthy controls. The frequency of exon 2 mutations was higher than exon 10 according to comparing results between study group and controls. The incidence of exon 2 and 10 mutations were statistical significant between the patients (all) and healthy controls.

All in all, our hypothesis should be tested with higher numbers of patients and controls.

**Keywords:** Familial Mediterranean Fever, HLA B-27, Ankylosing spondylitis, MEFV, Pyrin

## KAYNAKLAR

1. Çeliker R, Romatizma: Ankilozan Spondilit Klinik Özellikler, 2000;15.
2. Alan J. Silman, Josef S, Smolen Marc C. Hochberg, Michael E, Michael H, Romatoloji Cilt 2 bölüm 137.
3. Atagunduz MP, Tuğlular S, Kantarci G, Akoglu E, Direskeneli H. Association of FMF-related (MEFV) point mutations with secondary and FMF amyloidosis. *Nephron Clin Pract* 2004;96(4):131-5.
4. A Durmus D, Alayli G, Cengiz K, Yigit S, Canturk F, Bagci H. Clinical significance of MEFV mutations in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2009;76(3):260-4.
5. Brown MA. Non-major-histocompatibility-complex genetics of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:611-21.
6. Kirsty McHugh, Paul Bowness. The link between HLA-B27 and SpA-new ideason an old problem. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Sep;51(9):1529-39.
7. Merino E, Galocha B, Vazquez MN, Lopez de Castro JA. Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B\*1403 and B\*2705 proteins. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3693-704.
8. Khan MA. Ankylosing spondylitis: Clinical features. In: Klip pel JH, Dieppe PA (eds). *Rheumatology*. St. Louis: Mosby 1994;25:1-10.
9. Merino E, Galocha B, Vazquez MN, Lopez de Castro JA. Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B\*1403 and B\*2705 proteins. *Arthritis Rheum* 2008;58:3693704.
10. Urban RG, Chicz RM, Lane WS. A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1534-8.

11. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2002;277:23459-68.
12. Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zhu X, Stevanović S, Rammensee HG et al. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloar thropathies. *J Immunol* 1999;163:6665-70.
13. Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* 2011 Jul 10;43(8):761-7.
14. Gunal EK, Sarvan FO, Kamali S, Gul A, Inanc M, Carin M. et al. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. 2008;75(3):299-302.
15. Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev* 2007;6(3):183-9.
16. Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50:819-20.
17. Chen JH, Kono DH, Yong Z et al. A *Yersinia pseudotuberculosis* protein which cross-reacts with HLA-B27. *J Immunol* 1987;139:300-11.
18. [tipeu.cumhuriyet.edu.tr/cutbat/kongre1sunumlar/.../ankarasunum2](http://tipeu.cumhuriyet.edu.tr/cutbat/kongre1sunumlar/.../ankarasunum2)
19. Valentina Monticone E. Why is hla-b27 linked to artritric diseases?/2012.
20. Eren O, Koseoglu H, Arikan S. Antibody response to immunoglobulin binding protein (BIP) in ankylosing spondylitis. *Tıp Araştırmaları Dergisi:* 2010;8(3):156 -159
21. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973;1:9047.
22. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR . Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007;39:132937.
23. Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T. The chromosome 16q region associated with ankylosing spondylitis includes the candidate gene tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD). *Ann Rheum Dis* 2010;69:12436.
24. Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T. Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes Immun* 2010;11:4906.
25. York IA, Chang SC, Saric T et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002;3:117784.
26. Saric T, Chang SC, Hattori A. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 2002;3:1169-76.

27. Brown MA Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2008;47:132-7.
28. Rueda B, Orozco G, Raya E. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:145-14.
29. Karaderi T, Harvey D, Farrar C. Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series. *Rheumatology* 2009;48:3869.
30. Layh-Schmitt G, Colbert RA. The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:3927.
31. The international FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause Familial Mediterranean Fever. *Cell* 1997;90:797-807
32. The French Familial Mediterranean Fever Familial Mediterranean fever Consortium: A candidate gene for FMF. *Nat Genet* 1997;17:25-31.
33. Yu J-W, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S. Et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF- $\kappa$ B, via ASC oligomerization. *Cell Death and Differentiation* 2006;13:236-49.
34. Chromosome 16. A service of the U.S. National Library of Medicine. Reviewed November 2013.
35. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum* 2009;61(10):1447-53.
36. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998;351:659 – 64.
37. Özorun K, Tülek N, Düzgün N. Romatoid artrit (ra) ve sitokinler :interlökin-1 (il-1), interlökin-6 (il-6), tümör nekrozis faktör alfa (tnf-a) ve interferon gama (ifn-y). *J Fac Med* 1994;47:495-504.
38. Ben-Cherit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. A52 KD protein is a novel component of the SSA/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1998;167:1561-71.
39. Srinivasula, M. S.; Poyet, J.-L.; Razmara, M.; Datta, P.; Zhang, Z.; Alnemri, S. E. The Pyrin-Card Protein Asc Is An Activating Adaptor For Caspase-1. *J Biol Chem* 2002;277:21119–22.
40. Jae Jin C, Hirsh D, Jun C, Geryl W, Nina R. Targeted Disruption of Pyrin, the FMF Protein, Causes Heightened Sensitivity to Endotoxin and a Defect in Macrophage Apoptosis. 2003;11(3):591–604.
41. David B. Williams. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. Departments of Biochemistry and Immunology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, M5S 1A8

42. Shiohara M, taniguchi s, Masumoto J, Yasui K, Sagara j. ASC, which composed of aPYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1314-8.
43. McDermott, M.F. ve Aksentijevich, I. The autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:511-6.
44. Farivar S, Hassani M, Shiari R. Interleukin-1 as a Key Factor in the Development of Inflammatory Diseases. *Arch Pediatr Infect Dis* 2014;3(2):e18177.
45. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(2):95–104.
46. Gül A. Doğal immünite ve inflamasyonda pyrin ve ilişkili moleküler mekanizmalar. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Romatoloji B.D.
47. Mordechai Shohat, MD and Gabrielle J Halpern, MB, ChB. Familial Mediterranean Fever Synonym: Recurrent Polyserositis. Includes: Familial Mediterranean Fever Type 1, Familial Mediterranean Fever Type 2. August 8, 2000; Last Update: April 26, 2012.
48. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Gene* 2001;9:3-7.
49. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* 2006;6:183–95.
50. Stojanov and Kastner. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:586-99.
51. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9(7):473-83.
52. Masters SL, Yao S, Willson TA, Zhang JG, Palmer KR, Smith BJ, et al. The SPRY domain of SSB-2 adopts a novel fold that presents conserved Par-4-binding residues. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:77–84.
53. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003;11:591–604.
54. Onen F, Akar S, Birlik M, Sari I, Khan MA, Gurler O et al (2008) Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey. *J Rheumatol* 2008;35(2):305-9.
55. Khan MA. Ankylosing spondylitis: Clinical features. In: Klip pel JH, Dieppe PA (eds). *Rheumatology*. St. Louis: Mosby 1994;25:1-10.
56. Peynircioğlu B, Yılmaz E. Ailevi akdeniz ateşi hastalığının moleküler temeli. *Hacettepe Tıp Derg* 2006;37:223-9.



57. Aydın Z, Eren F. Ankilozan Spondilit Hastalarında MEFV (Mediterranean Fever) Gen Mutasyonları Sıklığının ve Hastalık Şiddeti Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2014;34(2):223-30.
58. Akkoc N, Sari I, Akar S, Binicier O, Thomas MG, Weale ME et al. Increased prevalence of M694V in patients with ankylosing spondylitis: additional evidence for a link with familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2010;62(10):3059-63.
59. Cosan F, Ustek D, Oku B, Duymaz-Tozgir J, Cakiris A, Abaci N, et al., Association of familial Mediterranean fever related MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3232-6.
60. Durmus D, Alayli G, Cengiz K, Yigit S, Canturk F, Bagci H. Clinical significance of MEFV mutations in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2009;76(3):260-4.
61. Kastbom A, Klingberg E, Verma D, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H, Wesamaa J et al. Genetic variants in CARD8 but not in NLRP3 are associated with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2013;42(6):465-8.

## TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>TABLolar</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Tablo 1.</b> 1966 New York kriterleri .....	4
<b>Tablo 2.</b> Modifiye New York kriterleri.....	4
<b>Tablo 3.</b> PCR protokolü .....	21
<b>Tablo 4.</b> Mastermix içeriği.....	22
<b>Tablo 5.</b> Mutasyonların ekzonlara göre dağılımı .....	24
<b>Tablo 6.</b> Hasta grubu ve mediterranean fever geni mutasyonlarının dağılımı.....	25
<b>Tablo 7.</b> HLA B*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 ve Ex.10 mutasyonları genotip frekansları.....	27
<b>Tablo 8.</b> HLA B*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 ve Ex.10 mutasyonları genotip frekansları.....	28
<b>Tablo 9.</b> HLA B*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.10 mutasyonları genotip frekansları.....	29
<b>Tablo 10.</b> HLA B*27(+) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV Ex.2 mutasyonları genotip frekansları.....	30
<b>Tablo 11.</b> HLA B*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV geni Ex.10 mutasyonu genotip frekansları .....	31
<b>Tablo 12.</b> HLA B*27(-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV geni Ex.2 mutasyonu genotip frekansları .....	32
<b>Tablo 13.</b> HLA B*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan MEFV (Ex. 2 ve Ex. 10) mutasyonlarının genotip frekansları.....	33

<b>Tablo 14.</b> HLA B*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan M694V mutasyonlarının genotip frekansları.....	34
<b>Tablo 15.</b> HLA B*27(+) ve (-) AS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunda saptanan E148Q mutasyonlarının genotip frekansları.....	35
<b>Tablo 16.</b> Seronegatif spondilartropatilerin ortak özellikleri .....	38
<b>Tablo 17.</b> Kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki mutasyonların karşılaştırılması.....	41

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> Major-Histocompatibility-Complex sınıf I molekülünün yapısı.....	5
<b>Şekil 2.</b> Artritojenik peptid sunumu .....	7
<b>Şekil 3.</b> HLA B27 yanlış katlanma hipotezi.....	8
<b>Şekil 4.</b> MEFV geninin 16. Kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olduğu yer .....	11
<b>Şekil 5.</b> a) MEFV gen ekzonları, b)Pyrin protein domainleri .....	13
<b>Şekil 6.</b> Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilişkinin şematik gösterimi.....	13
<b>Şekil 7.</b> Pyrin proteini şematik görüntüsü .....	14
<b>Şekil 8.</b> MEFV mutasyonlarının pirin proteininde karşılık geldiği yerler .....	16
<b>Şekil 9.</b> PCR-SSP yöntemi jel görüntüsü. 1-11 numaralı kuyular hasta grubu, 12. kuyu HLA-B*27 negatif kontrol, 13. kuyu HLA-B*27 pozitif kontrol ve 14. kuyu kör kontrol ..	20
<b>Şekil 10.</b> FMF Pyrosequencing analiz değerlendirmesi için örnek grafik .....	23
<b>Şekil 11.</b> Ankilozan spondilit hastalarında tespit edilen mediterranean fever geni mutasyonlarının dağılımları.....	26
<b>Şekil 12.</b> HLA B*27(+) AS Hastalarda Ekzon 10 mutasyon karşılaştırması.....	36
<b>Şekil 13.</b> HLA B*27(+) AS Hastalarda Ekzon 2 mutasyon karşılaştırması.....	36
<b>Şekil 14.</b> HLA B*27(+) ve (-) AS Hastalarda MEFV Gen (Ekzon 2 ve 10) mutasyon karşılaştırması.....	36
<b>Şekil 15.</b> HLA B*27(-) AS Hastalarda Ekzon 10 mutasyon karşılaştırması.....	37
<b>Şekil 16.</b> HLA B*27(-) AS Hastalarda Ekzon 2 mutasyon karşılaştırması.....	37

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul ilinin Silivri ilçesinde doğdum. 2005 yılında Silivri Süper Lisesi'nden mezun oldum. 2006 yılının ağustos ayında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2006-2010 yılları arasında lisans eğitimimi tamamladım. 2010 yılının eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans eğitimim esnasında Erasmus Programı ile Paul Sabatier Toulouse III Üniversitesi'nde bir dönem eğitim aldım.

## **EKLER**

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

İYİ NİYET BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUBADK 2011/129				
	PROTOKOL ADI	Lökosit Antijeni (HLA)-B27 Negatif Ankilozan Spondilit Tanılı Hastalarda MEFV Gen Mutasyonlarının Araştırılması				
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkez <input type="checkbox"/> Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 12/ 15	Tarih:08.06.2011				
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çalışmanın araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşulluyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜBADK Yönergesi					
ÜYELER						
Ünvanı/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyostatistik	T.Ü.T.F. Biyostatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yener YORUK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENLİ  
Dekan

## Ek 2

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu form, yürütülmesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanan bilimsel bir araştırma konusunda sizi bilgilendirmek ve gönüllü katılımınızı sağlamak amacıyla düzenlenmiştir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılmaya gönüllü olduğunuzda, sağlığınızın ve gönüllü olarak haklarınızın korunması ile gizliliğin sağlanması araştırmacıların ödevidir.

Araştırma, yalnızca uygun bilimsel eğitim ve niteliklere sahip araştırmacılar tarafından yürütülecektir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (AÇIK AD) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Açık olmayan bir bölüm varsa, daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız ya da araştırma başladıktan sonra sorularınız olursa istediğiniz zaman bize başvurabilirsiniz.

Katılacağınız araştırma ile ilgili bilgiler aşağıdadır:

**1. Araştırmanın bilimsel adı:** İnsan Lökosit Antijeni (HLA)-B27 pozitif ve B27 negatif Ankilozan Spondilit tanılı hastalarda MEFV gen mutasyonlarının araştırılması

**2. Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** İnsan Doku Grubu Antijenleri B27 olan ve olmayan Ankilozan Spondilit hastalarında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'ndan genetik olarak sorumlu olan gendeki (MEFV geni) mutasyonların araştırılması

**3. Sorumlu Araştırmacının adı, unvanı ve görev yeri:** Hilmi TOZKIR, Yrd.Doç.Dr , Trakya üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.

**4. Araştırmanın konusu ve niteliği (ilaç, klinik, laboratuvar, epidemiyolojik - tez çalışması vb....):**

\***Antijen:** Vücuda giren yabancı maddelere karşı kanda oluşan bir madde.

\***AAA:** Bağışıklık sistemindeki bir bozukluk sonucu gelişen irsi geçişi olan bir hastalıktır.

**5. Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Başlama tarihi – 01.09. 2011 – Öngörülen süre 12 ay

**6. Araştırmaya katılan gönüllü sayısı:** 150 gönüllü (50 HLA-B27 pozitif AS tanılı hasta, 50 HLA-B27 negatif AS tanılı hasta, 50 HLA-B27 negatif AS tanısı almamış sağlıklı kontrol)

## 7. Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:

### HASTA GRUBU:

- 18 yaşından gün almış olmak,
- Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,
- Herhangi bağışıklık sistemi hastalığı tanısı almamış olmak,
- Hamile olmamak,
- HLA-B27 pozitif ve HLA-B27 negatif klinik tanı kriterlerine göre AS tanısı almış olmak

### KONTROL GRUBU:

- 18 yaşından gün almış olmak,
- Birbirileri ile akrabalık ilişkisinin olmaması,
- Herhangi bir bağışıklık sistemi hastalığı tanısı almamış olmak,
- Hamile olmamak
- HLA-B27 negatif klinik tanı kriterlerine göre AS tanısı konmamış olmak

## 8. Araştırmada uygulanacak yöntemler:

Çalışmamıza Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na başvuran, İnsan Doku Grubu Antijenleri B27 olan ve olmayan klinik tanı kriterlerine göre AS tanısı konmuş, birbirileri ile akrabalık ilişkisi olmayan 100 hasta, birbirileri ile akrabalık ilişkisi olmayan İnsan Doku Grubu Antijenleri B27 olmayan sağlıklı 50 kişi dahil edilecektir. Hasta ve kontrol gruplarına dahil olan kişilerin her birinden kan alınarak, DNA'ları kit protokolüne uygun olarak izole edilecektir. Elde edilen DNA'lar belirlenen yönteme uygun olarak çalışılacaktır. Hasta ve kontrol grubunda MEFV genindeki yirmi iki mutasyonun varlığı/yokluğu bakılacaktır

## 9. Uygulama sırasında karşılaşabileceğiniz riskler, rahatsızlıklar ve olası yan etkiler:

Hasta ve kontrol grubuna dahil olan kişilerde periferik venöz kan alınırken enjektör iğnesinin battığı noktada duyulabilecek olan ağrı hissi, kan alınan bölgedeki doku hassasiyetine bağlı olarak gelişebilecek morluk olası risklerdir. Gönüllülere olası morluk gelişimini en aza indirmek için kan alınan bölgeye pamukla tampon uygulaması (en az 5 dakika) nerilecektir.

**10. Gönüllü için araştırmadan beklenen yarar:** Yapılan çalışma ile Ankilozan Spondilit Hastalığı'nın oluşum mekanizmaları hakkında veri elde edilecektir. Bu verilerin klinik bulgular ile birlikte değerlendirilmesi otoimmün hastalıkların oluşum mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayacağı ngrsndeyiz.

**11. Araştırma yöntemine alternatif olan tedavi ve girişimler:** Araştırmamızda herhangi bir tedavi planlanmamaktadır. Araştırma yöntemine alternatif olarak mevcut diğer yöntemlerin güvenilirliği düşük seviyede olduğundan tercih edilmemiştir.

**12. Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile araştırmaya katılan bir gönüllü olarak diğer hakları konusunda bilgi almak için bağlantı kurulacak kişinin adı-soyadı, nvanı, görev yeri ve telefon numarası.**

Adı-soyadı: Selin TAN

nvanı: Biyolog



Görev yeri: Trakya üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.

Telefon: 05366091830 -02842358186

**13. Araştırma bütçesi kimin tarafından karşılanıyor?**

Üniversite tarafından karşılanmaktadır.

**14. (Varsa) Sigortalamaya ilişkin bilgiler: Yok**

**15. Kimlik bilgilerinin ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?**

Gönüllüye ait kimlik bilgileri ve elde edilen veriler araştırmacı tarafından gizli tutulacak araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileri verilmeyecektir ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Gönüllü olan kişide istediğinde kendi tıbbi bilgilerine ulaşabilir.

**16. Klinik, laboratuvar araştırma ve tez çalışması.**

**17. Araştırmanın amacı:** Bu çalışmada insan Lökosit Antijeni (HLA)-B27 olan ve olmayan Ankilozan Spondilit (AS) tanılı hastalar ile HLA B27 olmayan sağlıklı kontrol grubunda MEFV gen değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmamıza katıldığınız için teşekkür ederiz.

## **GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA OLURU**

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Gönüllü Bilgilendirme Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu formun tamamının imzalı bir kopyası bana verildi.

***Gönüllünün; (bu bölüm gönüllünün kendi el yazısı ile doldurulacaktır)***

*Adı- Soyadı:*

*İmzası:*

*Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):*

.....

.....

*Tarih:*

***Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (bu bölüm veli/vasinin kendi el yazısı ile doldurulacaktır)***

*Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:*

*İmzası:*

*Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):*

.....

.....

*Tarih:*

***Gerekli durumlar için; (bu bölüm görüşme tanığının kendi el yazısı ile doldurulacaktır)***

*Görüşme Tanığının Adı- Soyadı:*

*İmzası:*

*Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):*

.....

.....

*Tarih:*

***Açıklamaları Yapan Araştırmacının (bu bölüm araştırmacının kendi el yazısı ile doldurulacaktır)***

*Adı- Soyadı, Ünvanı:*

*İmzası:*

*Tarih:*

### Ek 3

#### Sekans primerlerinin pyrosequencingdeki assay adı, okuduğu ekzon bölgesi ve dizilimi

Assay	Ekzon		Dizilim
FMF-1	2	wt E148Q	<b>C</b> GGG CTG GCT GCA <b>G</b> GGG CTG GCT GCA
FMF-2	3	wt P369S	<b>G</b> GCT TAG GCT <b>A</b> GCT TAG GCT
FMF-3	5	wt H478Y F479L	A/G GAG <b>C</b> AT TT <b>C</b> TTT GTG A/G GAG <b>T</b> AT TT <b>C</b> TTT GTG A/G GAG <b>C</b> AT TT <b>G</b> TTT GTG
FMF-4	10	wt S675N G678E M680L M680I(G>A) M680I(G>C) T681I	A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>A</b> TG <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>A</b> TG <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> AG AAC <b>A</b> TG <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>C</b> TG <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>A</b> TA <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>A</b> TC <b>A</b> CT CTG T A <b>A</b> GC AGG AAA <b>G</b> GG AAC <b>A</b> TG <b>A</b> TT CTG T
FMF-5	10	wt I692del M694V M694L M694I K695R K695M	G <b>A</b> TA ATG <b>A</b> TG <b>A</b> AG GAA AAT GA G --- ATG <b>A</b> TG <b>A</b> AG GAA AAT GA G <b>A</b> TA ATG <b>G</b> TG <b>A</b> AG GAA AAT GA G <b>A</b> TA ATG <b>T</b> TG <b>A</b> AG GAA AAT GA G <b>A</b> TA ATG <b>A</b> TA <b>A</b> AG GAA AAT GA G <b>A</b> TA ATG <b>A</b> TG <b>A</b> AG GAA AAT GA G <b>A</b> TA ATG <b>A</b> TG <b>A</b> TTG GAA AAT GA
FMF-6	10	wt R717S I720M V722M V726A	<b>C</b> GT GTG GGC AT <b>C</b> TTC/T <b>G</b> TG GAC/T TAC AGA <b>G</b> TT GGA AGC <b>A</b> GT GTG GGC AT <b>C</b> TTC/T <b>G</b> TG GAC/T TAC AGA <b>G</b> TT GGA AGC <b>C</b> GT GTG GGC AT <b>G</b> TTC/T <b>G</b> TG GAC/T TAC AGA <b>G</b> TT GGA AGC <b>C</b> GT GTG GGC AT <b>C</b> TTC/T <b>A</b> TG GAC/T TAC AGA <b>G</b> TT GGA AGC <b>C</b> GT GTG GGC AT <b>C</b> TTC/T <b>G</b> TG GAC/T TAC AGA <b>G</b> CT GGA AGC
FMF-7	10	wt A744S	A TTC <b>G</b> CC AGC A TTC <b>T</b> CC AGC
FMF-8	10	wt R761H	A <b>C</b> GT GAT A <b>C</b> A T GAT