

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA FAS GEN -670 A/G, FAS
LİGAND GEN -844 T/C POLİMORFİZİMLERİ VE MEFV GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine Gülce ÖZEL

Danışman
Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR
Doç. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA FAS GEN -670 A/G, FAS
LİGAND GEN -844 T/C POLİMORFİZİMLERİ VE MEFV GEN
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine Gülce ÖZEL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 24/12/ 2012 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Doç Dr Nizami DURAN
Üye: Doç Dr Ramazan GÜNEŞAÇAR
Üye: Doç. Dr. Ayşe Yıldırım
Üye : Yrd.Doç.Dr. Murat ÇELİK
Üye: Yrd.Doç.Dr. Bülent GÖĞEBAKAN

Bu tez, Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof Dr İbrahim KÜRTÜL

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; tez konumun seçilmesinde, yürütülmesinde ve yazımında yardımlarını esirgemeyen danışman hocalarım Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR ve Doç. Dr. Nizami DURAN' a,

Eğitimim süresince birlikte zaman geçirmekten mutluluk duyduğum tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Örneklerin toplanması sırasında benden yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Gülay Gülbol DURAN'a ,

Arkadaşlığının yanında tezimin laboratuvar aşamalarında da bana destek olan sevgili arkadaşlarım Sibel ELMACIOĞLU ve Şahin ÖZTÜRK'e

Her zaman yanımda olan varlığından güç aldığım arkadaşım Serkan ÇİMEN ve Tüm ÇİMEN Ailesine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen; annem Fatma Saniye ÖZEL ve babam Şafak ÖZEL'e,

İnsanlara sevgisini, fedakarlığını, hoşgörüsünü hayranlıkla izlediğim, hayatımı dualarıyla kolaylaştıran; canım anneannem Kadriye ŞENYÜZLÜ ve sevimliliği ile tüm ailemize neşe veren, yaşama sevincim, en kıymetlim, kardeşim K.Tuğçe ÖZEL'e,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Ailevi Akdeniz Ateşi	4
2.1.1.Tanım	4
2.1.2.Tarihçe.....	4
2.1.3. Hastalığın Moleküler Genetiği.....	6
2.1.4.Apopitozis	14
2.1.5. Fas-FasL Molekülleri	15
2.1.6. AAA'nın Epidemiyolojisi	17
2.1.7. Patogenez	19
2.1.8.Genotip-Fenotip İlişkisi.....	21
2.1.9.Klinik.....	22
2.1.9.1.Ateş.....	22
2.1.9.2. Karın ağrısı.....	22
2.1.9.3.Göğüs ağrısı.....	23
2.1.9.4. Eklem Tutulumu.....	23
2.1.9.5. Erizipel benzeri eritem	24
2.1.9.6. Akut Skrotum	24
2.1.9.2. Amiloidoz.....	24
2.1.9.3.Laboratuvar Testleri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Araç ve Gereçler.....	27
3.1.1 Araçlar	27
3.1.2. Kimyasal Maddeler	27

3.1.3.Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	28
3.1.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar	28
3.1.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar	28
3.1.3.2.Elektroforez Analiz Solüsyonları	29
3.2. Kan Örneklerinin Alınması	30
3.3. DNA İzolasyonu	30
3.4. PCR-RFLP Yöntemi ile Fas -670 A/G ve FasL -844 T/C Gen Polimorfizminin Belirlenmesi	31
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ.....	65
7. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

SayfaNo

Şekil 2.1.	AAA hastalarında hastalığın otozomal resesif geçişi	11
Şekil 2.2.	MEFV geninin 16. kromozom üzerindeki lokasyonunu	12
Şekil 2.3.	MEFV geni eksonları üzerinde tespit edilen belli başlı mutasyonlar	13
Şekil 2.4.	Pirin proteininin yapısı	14
Şekil 2.5.	Pirin protein ve fonksiyonel bölgeleri	15
Şekil 2.6.	Pirin ve ASC proteinlerinin fonksiyonel kısımları	16
Şekil 2.7.	Pirin inflamasyon hipotezi	16
Şekil 2.8.	Pirin ile ASC etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi	17
Şekil 2.9.	Proinflamatuvar sitokinlerin ASC ekspresyonu üzerindeki etkisi	18
Şekil 2.10.	İnaktif pyrin protein ve inflamasyon oluşumu	19
Şekil 2.11.	Apoptozis	20
Şekil 2.12.	Fas-FasL sinyal mekanizması	21
Şekil 2.13.	Fas, FADD, CARD ve PYD kimyasal kompozisyonu	22
Şekil 2.14.	AAA hastalığının global dağılımı	23
Şekil 2.15.	Türk toplumunda MEFV geni mutasyonlarının dağılımı	24
Şekil 2.16.	Amiloidozis oluşum mekanizması	27
Şekil 2.17.	Ailesel Akdeniz Ateşi hastalığında klinik bulgular	31
Şekil 4.1.	Fas geni -670 A/G polimorfiziminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü ..	47
Şekil 4.2.	FasL geni -844 T/C polimorfiziminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	48
Şekil 4.3.	E148Q heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü	57
Şekil 4.4.	M694V heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü	58
Şekil 4.5.	M680I heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü	59
Şekil 4.6.	V726A heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Primer dizileri ve amplifiye ürünlerin PCR büyüklükleri	39
Çizelge 3.2. Fas -670 A/G ve FasL -844 T/C gen polimorfizimleri için amplifikasyonun gerçekleştirildiği reaksiyon karışımı	40
Çizelge 3.3. Fas gen -670 A/G polimorfizimi için PCR program	40
Çizelge 3.4. FasL gen -844 T/C polimorfizimi için PCR program.....	41
Çizelge 3.5. Fas geni -670 A/G ve FasL geni -844 T/C polimorfizimlerinin kesim reaksiyon karışımları	42
Çizelge 3.6. Fas-FasLPCR ürünlerinin sırasıyla <i>MvaI(BstNI)</i> ve <i>BsrDI(BseMI)</i> enzimleriyle kesimi sonucu oluşan ürün boyları.....	42
Çizelge 3.7. PCR amplifikasyon karışımları	43
Çizelge 3.8. DNA dizileme karışımı.....	44
Çizelge 3.9. DNA dizilemede amplifikasyon döngüleri.....	44
Çizelge 4.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalarının demografik bulguları	46
Çizelge 4.2. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının klinik bulguları.....	47
Çizelge 4.3. AAA hastalarında Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T/C genotiplerinin dağılımı.....	48
Çizelge 4.4. Kontrol grubunda Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T/C genotiplerinin dağılımı.....	49
Çizelge 4.5. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında MEFV geni 2. ve 10. Ekzon mutasyonlarının allel dağılımları	50
Çizelge 4.6. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında MEFV geni 2.ve 10.ekzon mutasyonlarının genotip dağılımları.....	52

ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Fas Gen -670 A/G, Fas Ligand Gen -844 T/C Polimorfizimleri ve MEFV Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalıktır. Çalışmamızın amaçlarından biri, Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T fonksiyonel polimorfizimleri ile AAA arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Bu amaçla 97 AAA hastası ve 70 sağlıklı kontrolde PCR-RFLP yöntemi ile Fas gen-670 A/G ve FasL gen -844 T/C fonksiyonel polimorfizimleri çalışılmıştır. Çalışmamızın diğer amacı ise Hatay'da yaşayan 97 hastanın 92'sinde DNA dizi analizi yöntemiyle MEFV geninin 2. ve 10. ekzon mutasyonlarının sıklığı ve dağılımını araştırmaktır. Çalışmamızda, FMF hastaları ve kontrol grubu arasında Fas gen-670 AG genotipi ve G alleli frekansı yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır (AG genotipi için: GR = 0.732, %95 GA = 0.392-1.366, P = 0.344; G alleli için: GR = 1.192, GA = 0.766-1.855, P = 0.500). Buna karşın, FasL gen -844 TC genotipi hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmakla birlikte (GR = 0.413, %95GA = 0.213-0.800, P = 0.01), FasL gen -844 C alleli açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunamamıştır (GR = 0.972, %95 GA = 0.629-1.501, P = 0.912). Ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasında çalışılan her iki gen polimorfizmi açısından da fark bulunamamıştır. AAA hastalarının temel klinik bulgularıyla çalışılan polimorfizimler arasında korelasyon saptanamamıştır. Sonuçlarımız, Fas gen -670 AG genotipi ya da T alleli ve FasL gen -844 T allelinin AAA için bir risk faktörü olamayabileceğini, buna karşın FasL gen -844 TC genotipinin Türk popülasyonu için koruyucu bir faktör olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, 92 hastanın 71 (%77.17)'inde bir ya da daha fazla sayıda MEFV mutasyonu saptanmıştır. 92 hasta içinde aynı mutasyon tipini her iki allelde de bulunduran (homozigot) hasta sayısı 14 (%15.22), mutasyonların farklı kombinasyonlarını birleşik heterozigot halde bulunduran hasta sayısı 16 (%17.39), heterozigot hasta sayısı 34 (%36.96), kompleks genotipe sahip hasta sayısı ise 6 (%6.52) olarak belirlendi. 21 hastada mutasyon saptanamadı. Çalışmamızda en sık görülen mutasyon R202Q mutasyonu olup bağımsız allellerin %21.20'sinde mevcuttur. E148Q mutasyonu bağımsız allellerin %16.30'unda, M694V %11.41'inde, M694I %4.89'unda, V726A %4.89'unda, M680I %2.17'sinde saptanmış olup bunu A744S (%1.09), E230K (%1.09), K695R (%0.54) ve R761H (0.54) mutasyonları takip etmektedir. Sonuçlarımız, MEFV mutasyonlarının Türkiye'nin diğer bölgelerindeki gibi Hatay ilinde de oldukça heterojen olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Ailevi Akdeniz ateşi, Fas, FasL, MEFV, mutation

ABSTRACT

Investigation of MEFV Gene Mutations and Fas Gen -670 A/G, Fas Ligand Gen -844 T/C Polymorphisms in Patients with Familial Mediterranean Fever

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive autoinflammatory disorder characterized by recurrent fever, serositis, abdominal pain, arthritis, arthralgia and erysipelas like erythema.

There were two aims of the present study. The first aim was to investigate the association between Fas gene -670 A/G and FasL gene -844 T/C functional polymorphisms in patients with FMF and its relation to the main clinical features of the disease. The polymorphisms in the promoter regions of Fas gene -670 A/G and FasL gene -844 T/C have been investigated in 97 non-related FMF patients and 70 healthy controls by using PCR-RFLP technique. The second aim of the study was to identify the frequency and distribution of exons 2 and 10 mutations in the MEFV gene using DNA sequence analysis in 92 of 97 Turkish patients with FMF from Hatay Province.

The frequencies of Fas gene -670 AG genotype and G allele were not significantly different between FMF patients and healthy subjects (GR = 0.732, %95 GA = 0.392-1.366, P = 0.344 for AG genotype; GR = 1.192, GA = 0.766-1.855, for G allele, P = 0.500). The frequency of FasL gene -844 TC genotype was found significantly different between patients with FMF and healthy controls (GR = 0.413, %95GA = 0.213-0.800, P = 0.01) whereas C allele frequency was not significantly different between the groups (GR = 0.972, %95 GA = 0.629-1.501, P = 0.912). Haplotype frequencies of the studied polymorphisms were also not significantly different between FMF patients and controls. There were no correlations between the studied polymorphisms and the main clinical features of FMF such as fever, arthritis, arthralgia, abdominal and chest pain and erysipelas-like erythema. These results may suggest that Fas gene -670 AG genotype or T allele and FasL gene -844 T allele were not to be a risk factor, whereas FasL gene -844 TC genotype may be protective in the studied Turkish population. On the other hand, 92 patients studied, 71 (77.17%) had one or more MEFV mutations. Of those with mutations, 14 were homozygous, 16 were compound heterozygous, 16 were complex genotype, and 34 had only one identifiable mutation. Of the observed alleles, the most frequent mutation was R202Q (21.20%), followed by E148Q (16.30%), M694V (11.41%), M694I (4.89%), V726A (%4.89), M680I (2.17%), A744S(%1.09), E230K (%1.09), K695R (%0.54), and ve R761H (0.54) mutations. No mutation was found in 21 (%22.83) patients. Our results show that MEFV mutations are very heterogeneous in Hatay Province like other regions of Turkey.

Key words: Familial Mediterranean Fever, Fas, FasL, MEFV mutation.

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Türk, Arap, Ermeni ve Yahudi toplumlarında sık görülen, kendini sınırlayan, tekrarlayan ateş atakları, karın ağrısı, göğüs ağrısı, artrit ve plörezi ataklarıyla karakterize, otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir otoinflamatuvar hastalıktır. Hastalığın majör komplikasyonu böbrek yetmezliğine yol açan böbrek amiloidozunun gelişmesidir. AAA geni 1997 yılında Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından birbirinden bağımsız ve eşzamanlı olarak klonlanmış ve bu gene MEFV (MEditerranean FeVer) geni adı verilmiştir. Her iki araştırma grubu tarafından 16. koromozomun kısa kolu üzerinde bulunan MEFV geninin genomda yaklaşık 16 kilobazlık bir bölge işgal ettiği, 10 ekzon ve 9 introndan ibaret olduğu gösterilmiştir. Bu gruplar ayrıca M694V, M680I, V726A ve M694I olmak üzere 4 farklı MEFV gen mutasyonunun AAA hastalarının %80'inde bulunduğunu bildirmişlerdir (The International FMF Consortium 1997, The French FMF Consortium 1997)

AAA daha çok Doğu Akdeniz kökenli Yahudi, Ermeni, Türk ve Arap halkları arasında yaygın olduğu bildirilmiş olsa da, günümüzde göçlere bağlı olarak dünyanın çeşitli ülkelerinde hastalığa rastlamak mümkündür. Ülkemizde hastalığın prevalansının 10.000'de 1, taşıyıcılık oranını ise %20 dolaylarında olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark. 2001, Touitou ve Ben-Cherit 2009).

AAA'dan sorumlu genin ilk kez 1992 yılında yapılan bir çalışmada (Pras) 16. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olduğu gösterilmiş, daha sonra birbirinden bağımsız iki çalışma grubu tarafından AAA hastalığından sorumlu genin 16q 13.3 bölgesinde konumlandığı, 3505 nükleotid uzunluğunda, 10 ekzon ve 9 introndan oluştuğu ve 781 amino asitlik bir proteini (pirin/marenostrin) kodladığı gösterilmiştir (The International FMF Consortium 1997, The French Consortium 1997). Pirinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, inflamasyon mediatörlerinin baskılanmasında düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir (Grateau 2004). MEFV genindeki mutasyonlardan dolayı pirin proteininin fonksiyonunu yapmada yetersiz kaldığı, AAA hastalarında inflamasyona yatkınlığın bu yetersizlikten kaynaklandığı, hastalığın inaktif döneminde proinflamatuvar bir yanıtın olduğu, aktif dönemde ise inflamasyonun ortaya çıktığı düşünülmektedir (Stanjov ve Kastner 2005).

MEFV geninde şimdiye kadar gerek missense mutasyonu gerekse polimorfizimler olmak üzere 240'dan fazla sekans varyasyonu olduğu gösterilmiştir (<http://fmf.cnrs.fr/infevers/MEFV>). Bu mutasyonlardan 70'den fazlasının fenotip ilişkili olduğu gösterilebilirken 30'dan fazlasının ise hastalıkla ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir. Geri kalan diğer sekans varyasyonlarının ise patojenite ile ilişkisi net olarak belirlenememiştir. Çalışmalarda ekzon 10'da yer alan en yaygın 4 mutasyonun M694V, M694I, V726A ve M680I mutasyonları olduğu, daha nadir olmak üzere ekson 2, 3, 5 ve 9'da görülen mutasyonlar olduğu bildirilmiştir (Touitou 2000).

AAA hastalığı önceleri Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerle sınırlı endemik bir hastalık olarak tanımlansa da günümüzde dünyanın çeşitli ülkelerindeki toplumlarda hastalığa rastlamak mümkündür. Son zamanlarda AAA hastalarında mutasyon sıklığı ve tiplerinin ülkeden ülkeye, hatta bölgeden bölgeye değişebildiği bildirilmektedir. Ermenistan, Türkiye ve Irak Yahudilerinde taşıyıcılık oranının %20 ile %39 arasında değiştiği, en sık rastlanılan mutasyonların ise M694V, M680I, M694I ve V726A ve E148Q mutasyonları olduğu belirtilmiştir (Peynircioğlu ve Yılmaz 2001, Gershoni-Baruch ve ark.2001). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda ülkemizde AAA hastalığında çok sayıda MEFV geni mutasyonunun tespit edildiği, en sık görülen mutasyonların ise M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları olduğu bildirilmiştir (Akar ve ark.2000, Yalçınkaya ve ark.2000, Yılmaz ve ark.2001). İzmir, Diyarbakır, Kahramanmaraş ve Tokat bölgelerinde yapılan çalışmalarda en sık rastlanılan mutasyonların M694V, M694I, V726A ve E148Q olduğu bildirilmiştir (Güneşçar ve ark. 2005, Kılınç ve ark. 2006, Ülgenalp 2009, Evliyaoğlu ve ark. 2009, Şahin ve ark. 2009). Ülkemizde Doğu Anadolu, Karadeniz, Çukurova ve Ege bölgelerinde hastalığın sıklığı ve mutasyon dağılımı ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalara rastlanabilse de, Hatay bölgesinde AAA hastalığında mutasyon dağılımı ve frekansı konusunda daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bölgemizde AAA hastalarında DNA dizi analizi yöntemiyle daha önce mutasyon analizinin yapıldığı bir çalışma olmadığı için bölgemizde mutasyon tipleri ve sıklığına ilişkin bir veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda ailevi Akdeniz hastalarında MEFV geni mutasyon tipleri ve frekansının araştırılması yanında, çeşitli otoinflamatuvar hastalıklarda apoptozisde önemli rol oynayan Fas ve FasL gen polimorfizlerinin frekansı da araştırılmıştır. Programlanmış

hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, hemostazisin devamlılığını sağlayan önemli bir mekanizmadır (Vaux 1993). Apoptozisde rol alan Fas ve FasL gibi çeşitli sinyal molekülleri kusurlarının otoimmün hastalıkların gelişiminde oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Fas ve FasL etkileşiminin immün sistemin önemli bir regülatör mekanizması olduğu bildirilmektedir. FasL molekülü, bir hücre yüzey reseptörü olan Fas molekülüne bağlanarak, apoptotik kaskatı başlatmaktadır. Fas-FasL sistemi apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir mekanizma olup, Fas-FasL sistemindeki bozukluklar inflamatuvar hastalıkların da dahil olduğu birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır (Öktem ve ark.2001). Fas geni 10. kromozomda, FasL geni ise 1. kromozomda lokalize olmuş olup, her iki gende de polimorfizmler saptanmıştır (Sibley ve ark.2003). Fas geninin 5' promotor bölgesindeki -670 A/G polimorfizminde varyant allel olan G allelinin, Fas ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Sibley ve ark.2003, Kanemitsu ve ark.2002). FasL geninin promotor bölgesindeki -844 T/C fonksiyonel polimorfizminde ise varyant allel olan C allelinin transkripsiyon aktivitesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Kanemitsu ve ark. 2002).

AAA hastalığı ve Fas/FasL molekülleri arasındaki korelasyonun araştırıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlı olup sonuçlar birbirleriyle çelişkilidir. Bu çalışmalardan birinde amiloidoz gelişen hastalarda soluble Fas (sFas) düzeyleri yüksek bulunurken, başka bir çalışmada ise düşük olduğu bildirilmiştir (Kiraz 2003). Çalışmada inaktif hastalardaki sFas düzeyi yüksekliğinin kronik proinflamatuvar aktivite nedeniyle polimorfonükleer lökositlerin apoptozisinin gecikmesine bağlı olabileceği, amiloidli hastalardaki düşük sFas düzeylerinin ise artmış apoptozise katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Kiraz 2003). Bir başka çalışmada ise nötrofillerin yüzeyinde Fas ve FasL ekspresyonunun yüksek olduğu, akut atak dönemindeki AAA hastalarında nötrofil apoptozisinin arttığı gösterilmiştir (Özen 2001).

Bu çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına müracaat eden AAA hastalarında DNA dizi analizi yöntemiyle MEFV geni mutasyon sıklıklarının ve aynı hastalarda PCR-RFLP yöntemiyle ise Fas ve Fas ligand gen polimorfizmlerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. AAA hastalarında MEFV geni mutasyonlarının ve Fas-670 A/G ve FasL -844 T/C fonksiyonel gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışma bölgemizde ilk olup literature önemli katkı sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Ailevi Akdeniz Ateşi

2.1.1.Tanım: (AAA) Türk, Yahudi, Ermeni ve Araplarda sık görülen, etyolojisi tam olarak bilinmeyen peritonit, plörit, artrit, erizipel benzeri eritem ve tekrarlayan ateş nöbetleri ile karakterize, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Lightfoot 1993, Shohat ve Halpern 2011, Ben-Chetrit ve Touitou 2009).

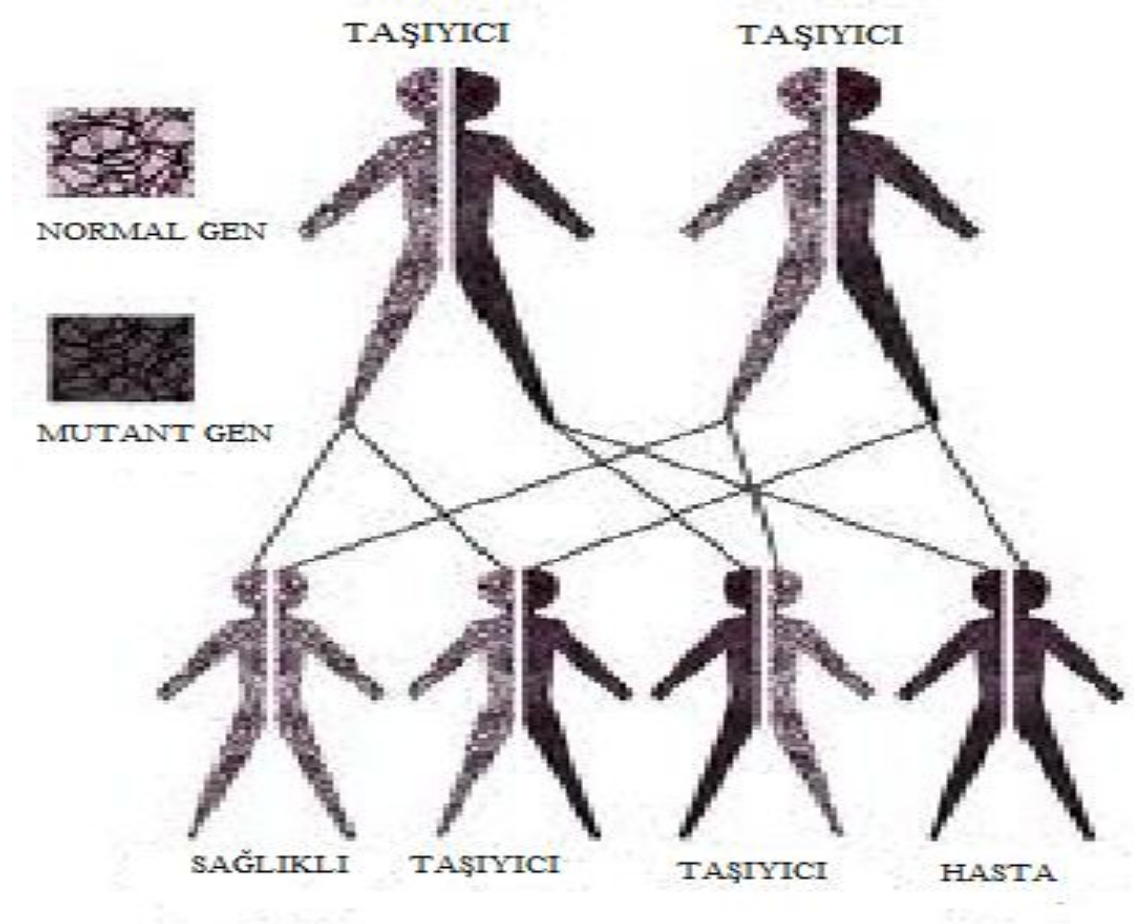
2.1.2.Tarihçe: Kalıtsal inflamatuvar bozukluklar grubunun bir prototipi olan bu hastalık, özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülke popülasyonlarında daha yaygın görüldüğü için "Ailevi Akdeniz Ateşi" olarak adlandırılmış olup hastalığın tarif edildiği zaman tam olarak bilinmemektedir (Touitou 2001, Ben-Chetrit ve Touitou 2009).

Hastalık ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından tekrarlayan ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan Yahudi bir kızda "olağan dışı tekrarlayan peritonit" adı ile tanımlanmıştır (Janeway ve Mosenthal 1908). Hastalık 1945 yılında Siegal tarafından "iyi huylu tekrarlayan preitonit" adı ile yeniden tanımlanmış olup sonrasında bu olgular için "tekrarlayan poliserozit ve periyodik hastalık" ismi verilmiştir (Çobankara ve Balkarlı 2011). Hastalığın ailesel geçişi ve amiloidozla olan ilişkisi 1951 yılında Mamau ve Kattan tarafından gösterilmiştir (Çobankaya ve Balkarlı 2011). Sohar ve arkadaşlarının önerisi doğrultusunda 1967 yılından bu güne kadar hastalık FMF (**F**amilial **M**editerranean **F**ever) ismi ile anılmaktadır (Odabaş ve ark.1999). 1972 yılında *Colchicum autumnale* (safra bitkisi)'nin köklerinden elde edilen doğal bir alkaloid olan kolşisinin hastalık ataklarını önlemedeki fonksiyonunun anlaşılması, hastalığın tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur (Goldfinger 1972).

AAA periyodik ateş sendromlarının genetik temeli tanımlanan ilk hastalığı olmakla birlikte aynı zamanda MEFV geni mutasyonlarının keşfedilen ilk sendromudur (Bodar ve ark.2008). Hastalığın kalıtımından sorumlu gen 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolunun 13.3 bandında tanımlanmıştır (Pras 1992). Bu gen daha sonra ilk kez 1997 yılında pozisyonel klonlama yöntemi kullanılarak Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından eş zamanlı olarak klonlanmıştır. Uluslararası AAA konsorsiyumu MEFV geninin kodladığı 781 amino asitlik proteine ateş teriminin

yunancası ifadesi olan “*Pyrin*” adını vermiştir, Fransız AAA konsorsiyumu ise Mare Nostrum’dan esinlenerek, “*Marenostrin*” olarak adlandırmıştır.

2.1.3. Hastalığın Moleküler Genetiği: Ailevi Akdeniz ateşi otoinflatuvar bir hastalık olup otozomal resesif geçiş göstermektedir.

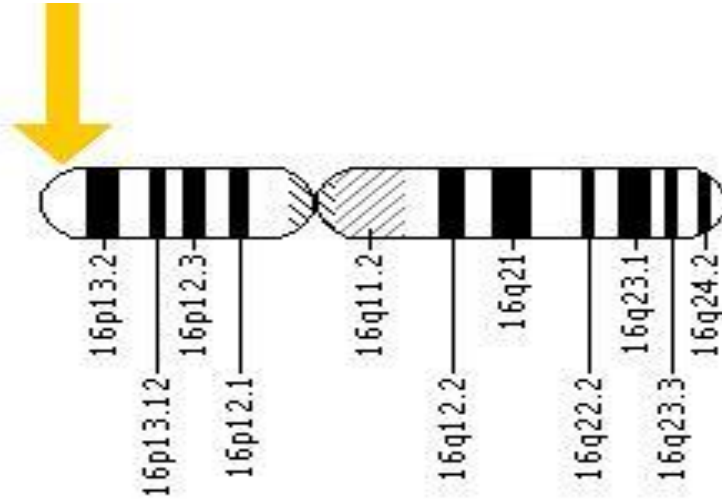


Şekil 2.1. AAA hastalarında hastalığın otozomal resesif geçişi.

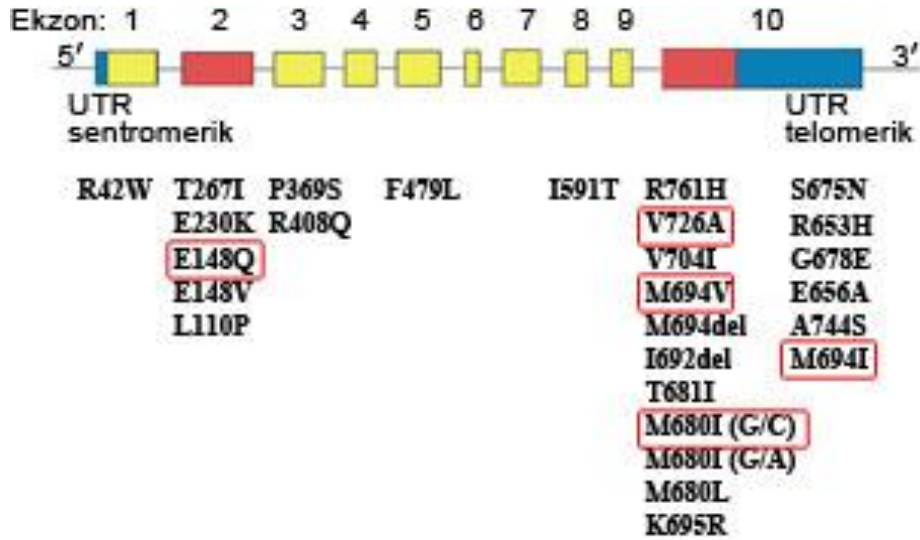
Hastalığın kalıtımından sorumlu gen (MEFV) 1992 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde (NIH) 16. kromozomun kısa kolunun 13.3 bandında (16p13.3) sırasıyla “telomer-D16S246-MEFV-D16S138-sentromer” olarak tanımlanmıştır (Pras 1992).

MEFV geni 1997 yılında iki farklı çalışma grubu tarafından birbirinden bağımsız ve eş zamanlı olarak farklı iki konsorsiyum (The International FMF Consortium, The French Consortium) tarafından klonlanmıştır. MEFV geni 10 ekzondan oluşmakta olup

781 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Kodladığı bu proteine “Pyrin” ya da “Marenostrin” adını verilmiştir.



Şekil 2.2. MEFV geninin 16. kromozom üzerindeki lokasyonu (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEFV>).



Şekil 2.3 MEFV geninin ekzonları ve üzerinde tespit edilen belli başlı mutasyonlar (<http://www.burclab.com/tr/genetik/teknik-bultenler/fmf>).

Bugüne kadar MEFV geninde meydana gelen mutasyonların 50'den fazlasının hastalığa neden olduğu ve bunların çoğunun missense mutasyon olduğu bildirilmiştir (Zadeh ve ark.2011). MEFV geni mutasyonlarının çoğunun 2. ve 10. ekzonda meydana geldiği bildirilmektedir. Bu mutasyonlardan 2. ekzonda bulunan E148Q mutasyonu ile ekzon 10'daki M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonlarının AAA vakalarının %80'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sayan ve ark., 2011). Bu 5 mutasyona yaygın kurucu mutasyonlar denmektedir (Gershoni-Baruch ve ark.2001).

M694V mutasyonu MEFV geninin 2080. pozisyonundaki adenin nükleotidi yerine guanin nükleotidin geçmesiyle (c.2080 A→G) ve sentezlenen pirin proteininde 694. pozisyonunda bulunan metioninin yerini valin amino asitinin almasıyla oluşmaktadır (The International FMF Consortium, 1997, The French Consortium, 1997).

M694I mutasyonu ise MEFV geninin 2082. pozisyonundaki guanin yerine adenin geçmesiyle (c.2082 G→A) oluşmakta olup sentezlenen proteinin 694. pozisyonundaki metionin yerini izolösin almaktadır (The French Consortium 1997).

M680I mutasyonunda genin 2040. pozisyonundaki guanin nükleotidinin yerine sitozin geçmekte (c.2040 G→C) ve bu kodonun kodladığı amino asit değişerek, proteinin 680. pozisyonundaki metionin yerine izolösin girmektedir (The International FMF Consortium, 1997, The French Consortium 1997). Benzer şekilde 2040. pozisyonundaki guanin nükleotidinin adeninle yer değiştirmesiyle (2040 G→A) M680I mutasyonunun olduğu da bildirilmiştir (Aksentijevich ve ark.1999).

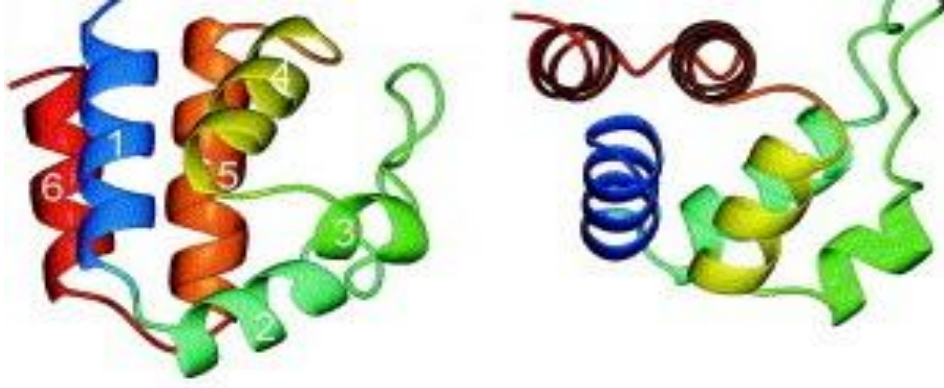
V726A mutasyonu MEFV geninin 10. eksonunda meydana gelmekte ve burada genin 2177. pozisyonundaki timin, sitozinle yer değiştirmekte (c.2177 T→C) ve sentezlenen pirin proteininin 726. pozisyonundaki valin yerini alanin almaktadır (The International FMF Consortium 1997, The French FMF Consortium 1997).

E148Q mutasyonu ise MEFV geninin 2. ekzonunda meydana gelmekte olup genin 442. pozisyonundaki guanin, sitozinle yer değiştirmiştir (c.442 G→C). bu yer değiştirme sonucu sentezlenen pirin proteininin 148. pozisyonundaki glutamin yerine glisin amino asiti geçmektedir (Bernot ve ark.1998).

Klasik AAA semptomları gösteren ve Akdeniz bölgesindeki etnik kökenden gelen hastaların büyük çoğunluğu homozigot veya birleşik heterozigottur (Zadeh ve ark.2011). Tek mutasyonun tespit edildiği bireylerde ise hastalığa yol açan ikinci bir mutasyonun genin kodlama yapmayan intronik bölgelerinde meydana gelmiş olabileceği

düşünülmektedir ki, bu durumda mRNA splysing ve ekspresyonunun etkileneceği bildirilmektedir (Zadeh ve ark.2011).

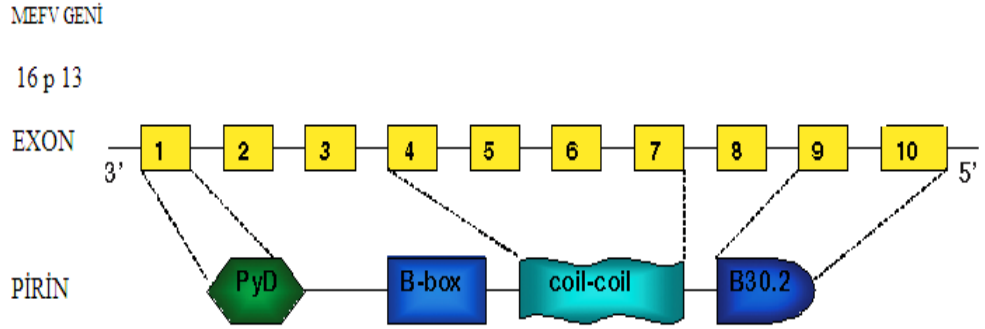
MEFV geninin kodladığı pirin proteini 86 kD moleküler ağırlığa sahip olup, DNA'ya bağlanma aktivitesi bulunan bazı proteinlerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 2.4. Pirin proteininin yapısı (Liepinsh ve ark., 2003).

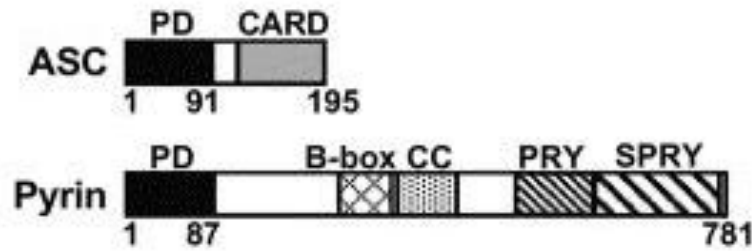
Bu proteinlerin arasında Ro/SSA ribonükleoprotein, interferon indükleyici transkripsiyonel regülatör Staf 50, interlökin 2 reseptörünün down regülasyonunu sağlayan rpt-1 (regülatör protein T lenfosit 1), kurbağada mitotik kromozomlara bağlanan bir faktör olan Xnf7 (Xenopus nükleer faktör 7) ve butirofilini de kapsayan birkaç peptit yer almaktadır. Ayrıca pirin sekans motiflerinin bilgisayar analizi iki varsayımsal nükleer lokalizasyon sinyali ile birlikte bir bZIP transkripsiyon faktör domeini ortaya koymakta olup bu bulgular pirinin bir transkripsiyon faktörü olduğunu düşündürmektedir.

Pirin proteini dört fonksiyonel domain (bölge) içerir. Bunlar; PyD veya DAPIN olarak da isimlendirilen N terminal PİRİN domaini (1-300 aa), BB-ZF (B box zinc finger, 375-407 aa), alfa helical bölge ya da “coiled coil” domain (408-594 aa) ve karboksi terminal uçta bulunan B.30.2 domainidir (Chae ve ark.2006, Richards ve ark.2001).



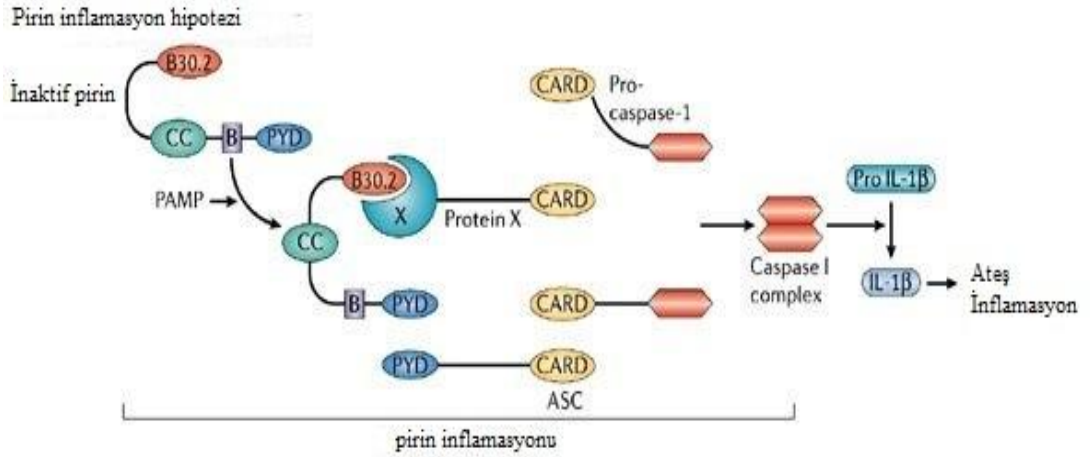
Şekil 2.5. Pirin protein ve fonksiyonel bölgeleri (Bodar ve ark. 2008).

PyD 92 amino asitten oluşmakta olup ölüm domeinleri (death domains: DD), ölüm efektör domeinleri (death effector domains: DED) ve kaspaz çalıştırıcı domeinlerini de (Caspase Recruitment Domains: CARD) kapsayan ölüm domeini süperaillesinin üyesidir. Ölüm domeini süperaillesinin üyeleri apoptozis ve inflamasyon proteinlerinin bir çoğunda bulunmakta ve protein-protein etkileşimi yoluyla sitokin aktivasyonunu sağlamaktadır. (Fairbrother ve ark.2001, Chae ve ark.2006). Pirin'in C-terminal bölgesinde yer alan "B-box" ve "coiled coil" domainleri multimerizasyonda görev yapmakta, C-terminal kısmındaki B30.2 domaini ise protein-protein etkileşimini sağlamaktadır (Hashim ve ark. 2010).



Şekil 2.6. Pirin ve ASC proteinlerinin fonksiyonel kısımları.

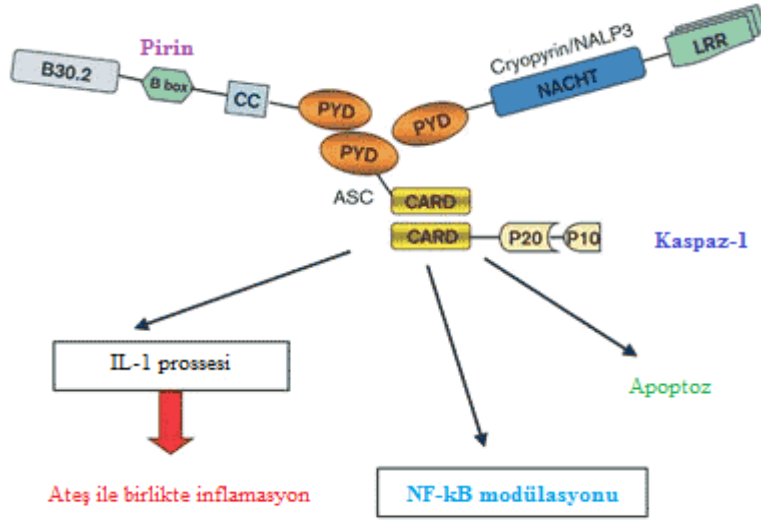
ASC pirin ile ilişkili bir proteindir. PyD ve CARD proteinleri birleşerek proapoptotik ASC'yi oluşturur. ASC pirin ile bağlanarak nötrofillerde ASC ile indüklenmiş apoptozisi modüle eder (Richard ve ark.2001).



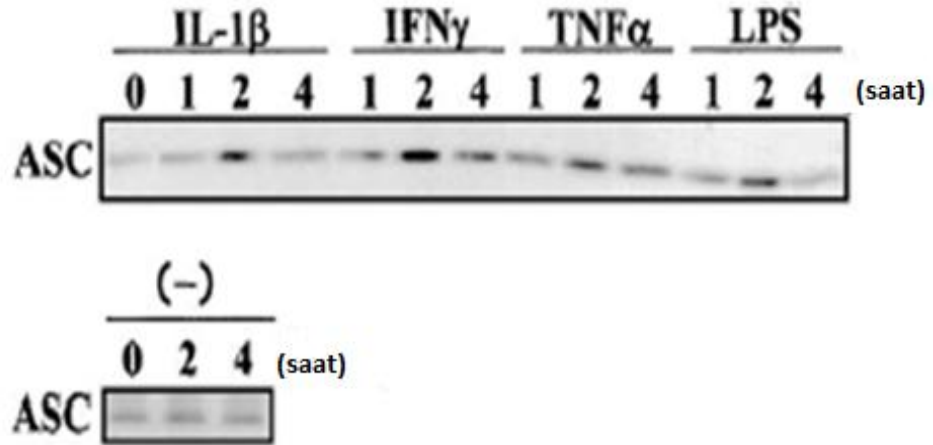
Şekil 2.7. Pirin inflamasyon hipotezi (Jenny 2006)

Şiddetli inflamasyonun bulunduğu alanlarda, nötrofillerde ASC ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Proinflamatuvar mediatörler nötrofillerde ASC ekspresyonunu *in-vitro* olarak artırmaktadır. ASC'nin anti-Fas antikoru ya da soluble Fas ligandı ile arttığı, bununla birlikte Fas aracılı indüksiyonun kaspaz inhibitörleriyle inhibe edildiği tespit edilmiştir. ASC'nin nötrofil inflamasyonu ve apoptozis ile yakın ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (McDermont 2002)

Pirin ile ASC etkileşimi interlökin (IL)-1 beta sekresyonu, nükleer faktör kappa B (NF-KB) aktivasyonu ve apoptozun regülasyonunda rol oynar. ASC hem "pirin" domainleri aracılığı ile pirine bağlanır, hem de CARD-CARD bağlanması yoluyla kaspaz-1'i oligomerize edip ASC-kaspaz 1 etkileşimini sağlamaktadır. ASC-kaspaz 1 etkileşimi sonucu kaspaz 1 aktive olarak, IL-1 beta prekürsörünün biyolojik olarak aktif olan, ateş ve inflamasyondan sorumlu aktif IL-1 beta şekline dönüşmesi sağlanır (Kastner ve Aksentijevich 2005, Grateau 2004, Stanjov ve Kastner 2005).



Şekil 2.8. Pirin ile ASC etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi (www.medscape.com).



Şekil 2.9. Proinflamatuvar sitokinlerin ASC ekspresyonu üzerindeki etkisi.

Proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IFN, TNF ve LPS) maksimum ASC ekspresyonu yaptığı ve daha sonra ekspresyon seviyelerinin bazal düzeye indiği bildirilmiştir (Papin ve ark.2007). Bu sitokinlerin hücre kültürüne eklendiğinde, nötrofillerde ASC ekspresyonunda artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Bu sitokinler apoptozu geciktirerek nötrofillerin sağ kalımını, artırmaktadırlar. (<http://www.afigberdeli.com/caps.html>).

Bunun yanında pirin proteininin sitokinin üretimini ihhıbe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Papin ve ark.2007). Bu çalışmalarda pirinin ASC'nin kaspaz-1 e bağlanmasını ihhıbe ettiği düşünülmektedir. Bir alışmada C terminal B30.2 bölgesinin doğrudan kaspaz-1 ile etkileşim içinde olduğu ve IL-1b'nin üretimini ihhıbe ettiği gösterilmiştir (Chae ve ark.2006). Pirin proteininin, ASC ile indüklenen IL-1b aktivasyonunu engelleyerek ve makrofaj apoptozuna yol açarak anti-inflamatuvar bir molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Chae ve ark.2004).

Pirin proteini interlökin IL-1a'nin aktivasyonu yoluyla da apoptozu düzenleyebilmektedir (Ugan ve ark.2011). Proinflamatuvar sitokin olan IL-1a'nin AAA hastalığının patogenezinde oldukça önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Apoptoz pirin tarafından hem indklenebilmekte ve hem de ihhıbe edilebilmektedir (Bodar ve ark. 2008). Pirin proteininin proinflamatuvar sitokin üretimine neden olduğuna dair çeşitli çalışmalar mevcuttur. Pirin'in IL-1b, IL-18 ve IL-33 oluşumuna yol açan inflammasyon oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Yu ve ark.2006).

Nötrofiller inflamasyon alanındaki fonksiyonlarını tamamladıktan sonra nedeni kesin olarak bilinmeyen bir mekanizma ile apoptozise uğramaktadırlar (Shiohara 2002). Pirin proteininin biyolojik fonksiyonunun inflamasyon mediatörlerinin regülasyonunu azalttığı ve nötrofillerin apoptozisine yol açmasıdır. Mutant pirin proteininin bu fonksiyonu yerine getirmede daha az etkili olabileceği düşünülmektedir (McDermot ve ark.2002). AAA'da MEFV mutasyonuna bağlı olarak pirinin defektif olması sonucu inflamasyona yatkınlılığının arttığı ve hastaların proinflamatuvar bir seyir gösterdiği, ataklar sırasında inflamasyonun belirgin hale geldiği kabul edilmektedir (Kastner ve Aksentijevich 2005, Grateau 2004, Stanjov ve Kastner 2005).

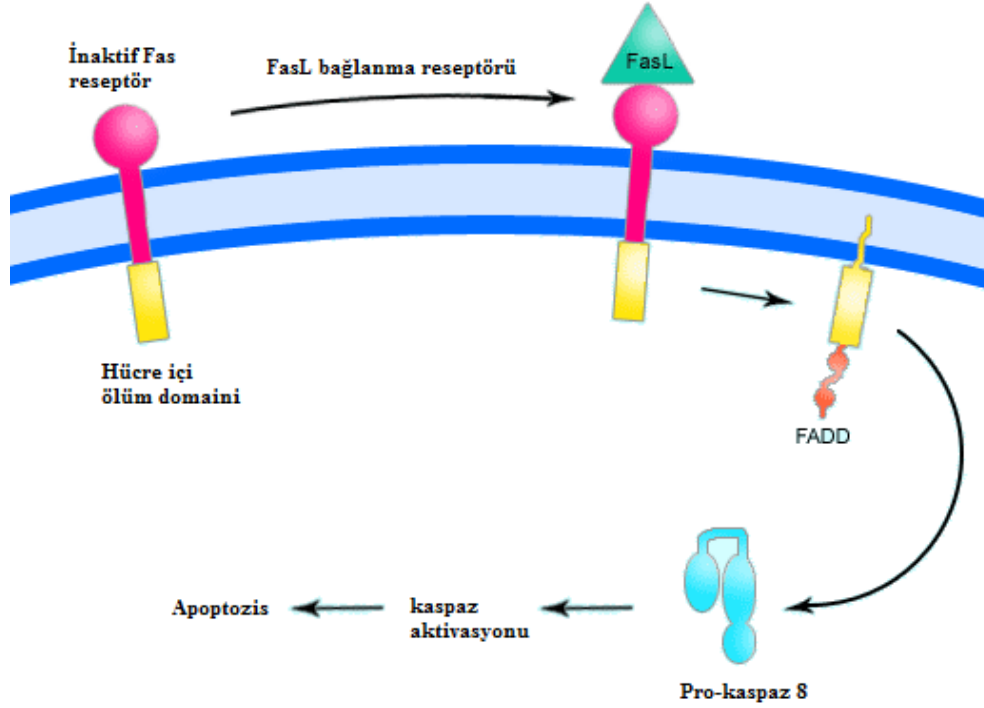


Şekil 2.10. İnaktif pirin protein ve inflamasyon oluşumu.

2.1.4. Apoptozis

Apoptozis, hücrenin kendini yok etmek için çeşitli metabolik ve fizyolojik faaliyetlerini devreye soktuğu bir olaydır. Yapılan bir çalışmada apoptozis ve sinyal iletim mekanizması arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Vaux 1993). Her hücre, yaşamını devam ettirmek için diğer hücrelerden devamlı olarak sinyal almaktadır. Bu sinyal akışının herhangi bir şekilde bozulması veya sinyal iletiminin kesilmesi hücreyi ölüme sürüklemektedir. Apoptozis, homeostaz mekanizmaları için gerekli olduğu kadar birçok inflamatuvar hastalığın patogenezinde de rol oynar. Fas/FasL ve sFas proteinlerinin çeşitli otoimmün hastalıkların gelişiminde rol oynadığı ve hücrede apoptozise yol açtığı bildirilmektedir (Öktem ve ark.2001).

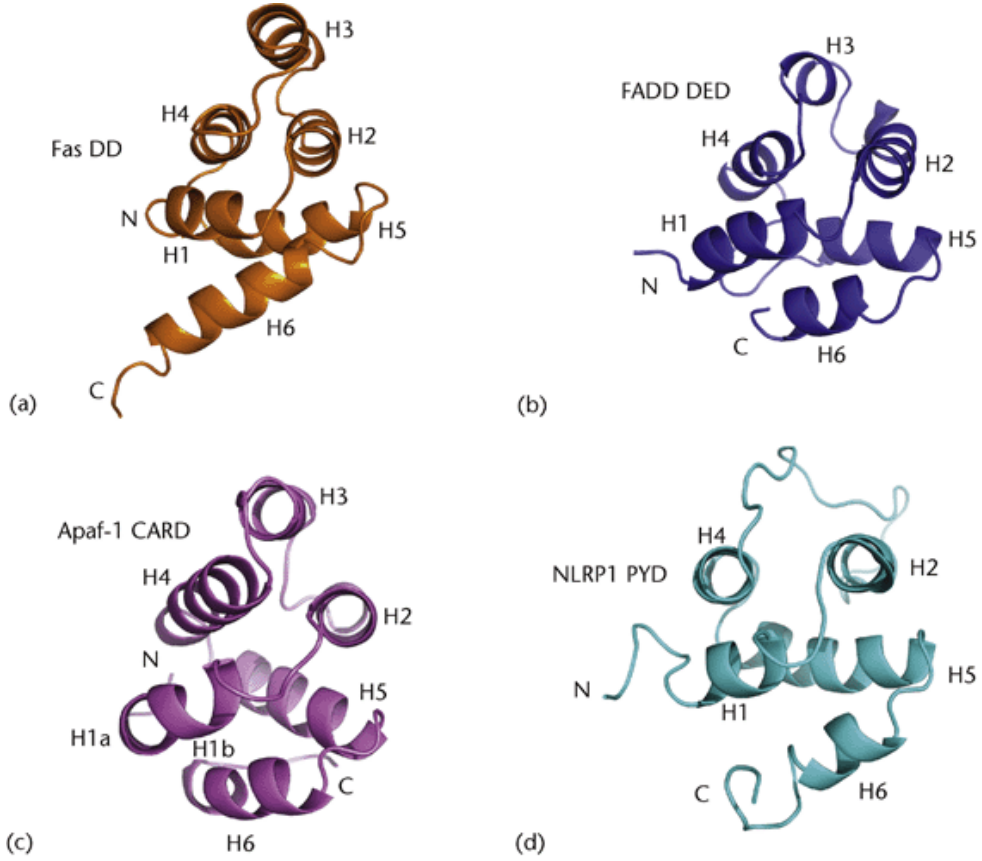
2.1.5. Fas-FasL Molekülleri: Fas-FasL sinyali apoptozis induksiyonunda bilinen en iyi mekanizmadır (Gilhar ve ark.2006, Oskay ve Erdem 2000).



Şekil 2.12. Fas-FasL sinyal mekanizması.

Tümör nekroz faktör (TNF) süperailisinin bir üyesi olan ve hedef hücrelerde apoptozu başlatan Fas (Apo-1, CD95) 45 kDa moleküler ağırlığa sahip tip1 membran proteinidir. Nötrofillerin de içinde bulunduğu çeşitli hücre ve dokularda eksprese edilmekte ve birçok hücre tipinde apoptozis sinyalinde merkezi rol oynamaktadır. Fas reseptörünün ligandı (FasL) 40 kDa büyüklüğünde olup, dolaşımında dimer ya da trimer şeklinde bulunur. Reseptör-ligand (Fas-FasL) etkileşiminin birçok fizyolojik süreçte apoptozisin primer mediyatörü olduğu bildirilmiştir (Grell ve ark. 1994). FasL'in hücre yüzeyindeki Fas reseptörüne bağlanması sonucu sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılmaktadır. Kimyasal, fiziksel ya da çeşitli infeksiyonlar sonucu hasar gören hücrelerde IL-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin etkisi ile hücre yüzeyinde Fas ekspresyonu başlamaktadır. Bu süreç Fas proteininin "up-regülasyonu" olarak adlandırılmaktadır. Bu olay esnasında hücreler FasL yapımı için uyarılırlar ve FADD (Fas ile ilişkili ölüm domaini) aracılığıyla oluşan Fas-FasL bağlanması sonucu prokaspaz 8 ve 2'nin

aktivasyonu sağlanarak hücrenin apoptozise gitmesi indüklenmiş olur (Grell ve ark.1994, Ashkenazi ve Dixit 1998).



Şekil 2.13. Fas, FADD, CARD ve PYD moleküllerinin kimyasal kompozisyonu (Gottfried ve ark.2003).

Fas'ın antagonisti olarak fonksiyon gören sFas, Fas molekülünün FasL'ye bağlanmasını sınırlayarak Fas aracılı apoptozisi inhibe etmektedir. Türkiye'de 2003 yılında yapılan bir çalışmada remisyonadaki AAA hastalarında sFas ligand düzeyinin arttığı ve bu nedenle polimorfonükleer lökositlerin apoptozunun bozularak sublinik inflamatuvar aktiviteye neden olduğu bildirilmiştir (Kiraz 2003).

Fas geni 10. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olup 9 ekzon ve 8 introndan ibarettir. FasL geni ise 1. kromozomda bulunmakta ve 4 ekzon 3 intron içermektedir. Her iki gende de çok sayıda polimorfizm saptanmıştır. Fas geninin 5' promotor bölgesindeki - 670 A/G tek nükleotid polimorfizmi gama interferon aktivasyon bölgesinde yer alır. Bu

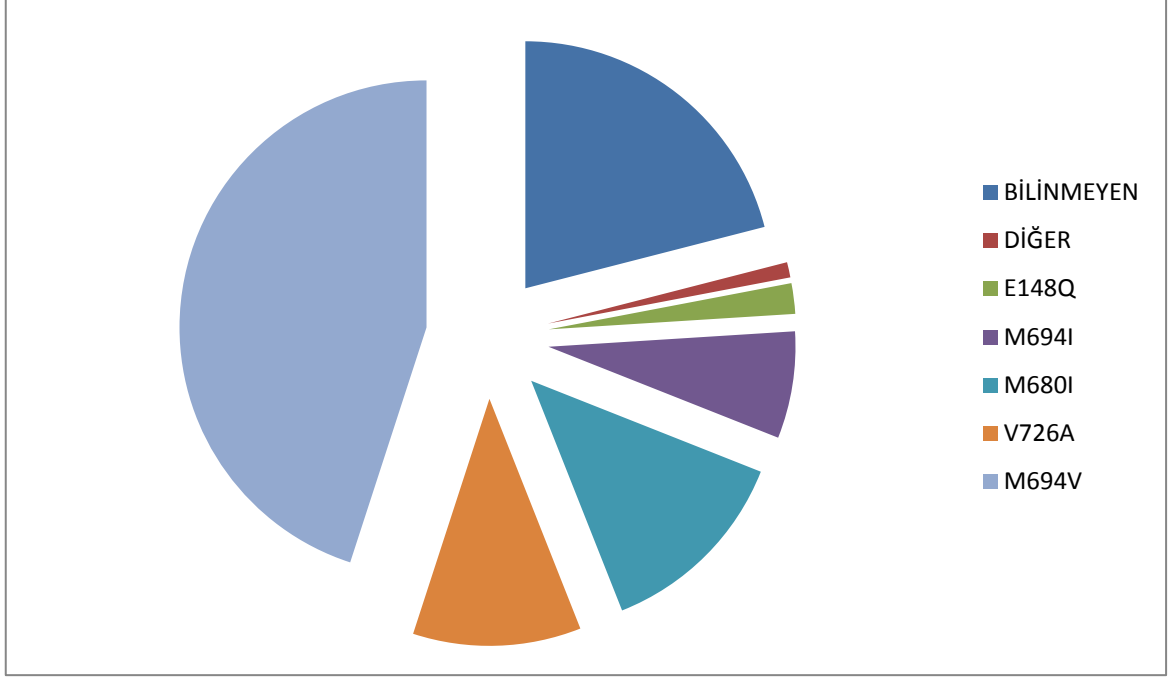
bölge sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri (signal transducers and activator of transcription, STAT) gibi transkripsiyon faktörlerine bağlanarak Fas geninin transkripsiyonunu etkilemektedir (Sibley ve ark.2003). Fas-670 G allelinin Fas ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Sibley ve ark.2003, Kanemitsu ve ark.2002).

FasL geninin promotör bölgesindeki -844 T/C fonksiyonel polimorfizmi de “CAAT/enhancer binding protein beta” olarak isimlendirilen diğer bir transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinde yer almaktadır. C allelinin, T allelinden daha yüksek bazal transkripsiyon aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Kanemitsu ve ark. 2002).

2.1.6. AAA'nın Epidemiyolojisi

AAA hastalığı özellikle Akdeniz bölgesinde yaşayan insanları etkilemektedir. Hastalık başta Araplar, Ermeniler ve Türkler olmak üzere, Yunanlılar, İtalyanlar, Kuzey Afrika Yahudileri ile Sefarad ve Aşkenaz Yahudilerinde görülmektedir (Zadeh ve ark.2011). Bunun yanında Akdeniz halkları soylarından olmayanlarda da hastalığın görüldüğü bildirilmektedir. Japon, Çin, Avrupa ve Güney Amerika kökenli bireylerde de bu hastalığın görüldüğüne dair bazı kayıtların olduğu bildirilmektedir (Zadeh ve ark.2011). Bununla birlikte Sahra-altı Afrika, Etiyopya, Yemen, İskandinav ülkeleri, Güney Asya, Hindistan, ve Tayland gibi ülkelerde AAA hastalığının bildirilmediği toplumlar da mevcuttur (Zadeh ve ark.2011).

Türkiye, dünyanın AAA hasta sayısının en yüksek olduğu ülkesidir. AAA prevalansı yaklaşık olarak 1:300 ile 1:1.000 arasında olup nüfusun yaklaşık 70 milyon civarında olduğu göz önüne alındığında, Türkiye’de 100.000’den fazla AAA hastası olduğu tahmin edilmektedir (Touitou ve Ben-Cherit 2009). Şimdiye kadar yapılan çeşitli çalışmalarda Türkiye’de AAA hastalarında görülen en yaygın mutasyonların M694V, M680I, V726A ve M694I olduğu bildirilmiştir (Turkish FMF Study Group 2005).



Şekil 2.15. Türk toplumunda MEFV geni mutasyon dağılımı (Touitou, 2001).

Ermenistan'ın AAA prevalansının en yüksek ikinci ülke olduğu sanılmaktadır. Prevalansı yaklaşık olarak 1:500 dolaylarında olup ülkede yaklaşık 6.000 AAA hastasının olduğu tahmin edilmektedir (Touitou ve Ben-Cherit 2009). Ermeni hastalarında mutasyonların büyük oranda tanımlandığı, mutasyonların sadece küçük bir kısmının (%16) henüz tanımlanamadığı bildirilmektedir. Dünyanın çeşitli ülkelerine dağılmış olan Ermeniler arasında benzer mutasyon dağılımlarının olduğu bildirilmiştir. Erivan'da yaşayan Ermeniler ile Kaliforniya ya da Fransa'da yaşayan Ermeniler arasında mutasyon dağılımı konusunda herhangi bir farklılık tespit edilememiştir (Touitou 2001).

AAA hastalığının yüksek insidanda görüldüğü ülkelerden biri olan İsrail'de ise AAA prevalansının 1:1000 olduğu, 10.000'den fazla hastanın bulunduğu tahmin edilmektedir (Daniels ve ark. 2005). Yahudi toplumlarındaki mutasyon dağılımları incelendiğinde Kuzey Afrika Yahudilerinde en sık M694V mutasyonunun bulunduğu görülürken (%71), Doğu Avrupa Yahudilerinde ise V726A mutasyonunun en yüksek oranda (%38) saptandığı bildirilmiştir.

Ürdün, Suriye ve Lübnan gibi Orta Doğudaki diğer ülkelere de birçok AAA hastası olduğu bilinmekte olup toplam hasta sayısı hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir (Touitou ve Ben-Cherit 2009). Bununla birlikte Arap popülasyonlarındaki mutasyon dağılımları ülkelere göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, Ürdün'de en sık görülen

mutasyonun M694V mutasyonu olduğu bunu V726A mutasyonunun takip ettiği bildirilmiştir. Bir çalışmada ise Ürdün ve Lübnan'da AAA hastalarında en sık görülen mutasyonların M694V ve M694I olduğu bildirilmiştir (Medlej-Hashim ve ark.2005). Suriye'de ise en yaygın mutasyon tipinin M694V mutasyonu olduğu, Mısırlı AAA hastalarında ise V726A mutasyonunun en yüksek frekansta görülen mutasyonlar olduğu bildirilmiştir (Shoat ve Halpern 2011).

AAA'da taşıyıcılık oranları hastalığın görüldüğü bütün toplumlarda yüksektir. Taşıyıcılığın Irak Musevilerinde %39, Ermenilerde %37, Aşkenazi Musevilerinde %21 ve Türklerde %20 dolaylarında olduğu bildirilmektedir. (Peynircioğlu ve Yılmaz 2006).

2.1.7. Patogenez

AAA hastalığına yol açan MEFV geni ürünü pirin apoptozun ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev yapan protein sınıfının bir üyesidir. MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar kusurlu ürünlerin sentezlenmesine yol açacağından inflamasyon kontrolü de bozulmaktadır. Pirin'in IL-1b salgılanması, NFkB aktivasyonu ve apoptoz üzerindeki etkilerinden dolayı inflamasyon ile ilgili değişik sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Lidar ve Livneh 2007).

Mutant olmayan MEFV geninin ekspresyonu ile oluşan normal pirin kaspaz-1'in aktivasyonunu regüle etmek ve sonuçta IL-1beta üretimini düzenlemek amacıyla AAA mutasyonlarının yerleştiği yer olan C terminal B30.2 domaini ile direkt olarak etkileşime girmektedir. Bu bölgedeki mutasyonlar AAA hastalarında daha az IL-1beta aktivasyonuna yol açmakta ve IL-1 cevapsızlığı ile inflamatuvar ataklarda artışlara sebep olmaktadır (Shoat ve Halpern 2011, Chae ve ark.2006, Chae ve ark.2008).

Çoğu otoimmün hastalığın oluşumunda ortak yolun kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 salınımının olduğu bildirilmiştir. Monogenik hastalıklarda da bu durum söz konusudur. Çünkü aktive kaspaz1'i birleştiren moleküler yollardan biri uygun olmayan koşullarda aktive edilebilmekte veya bir mutant protein sayesinde yetersiz şekilde düzenlenebilmektedir (Savica ve ark.2012).

AAA hastalığının patogenezinin daha iyi anlaşılması amacıyla özellikle Pirin ve pirin ile ilişkili proteinler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Pirin ile ilişkili proteinlerden biri de ASC' dir. ASC, prokaspaz-1'e bağlanarak agrege olabilmekte ve otoaktivasyonu başlatabilmektedir. Aktif kaspaz 1, pro-IL-1 b'yi IL-1b'ye çevirmekte ve salgılanan IL-1

AAA hastalığında gelişen amiloidoz, AA tipi amiloid fibrillerinden oluşmakta ve SAA (Serum Amyloid-A) olarak isimlendirilen yüksek dansiteli bir lipoproteinin komponenti olan büyük bir öncül proteinden meydana gelmektedir (Peynircioğlu ve Yılmaz 2006).

2.1.8.Genotip-Fenotip İlişkisi: AAA hastalığında her geçen gün ilerleme kaydeden tanı testleri hastalığın genotip-fenotipi ilişkisine yönelik yeni korelasyonların kurulmasına olanak sağlamaktadır. Hastalığın şiddeti, hastanın genotipinde bulunan mutasyona uğramış allelerin sayısına ve kombinasyonuna bağlı olup, mutasyona uğramış olan alleller fenotipi değiştirebilmekte, kronik komplikasyonları arttırabilmekte veya önleyebilmektedir (Touitou 2001). AAA'da gelişen amiloidoz AA tipi, sekonder veya reaktif amiloidoz olarak bilinmektedir. (Kıykım ve ark.2000). Ayrıca, genotip-fenotip ilişkisinin en belirgin olduğu durumun, pirin genindeki M694V homozigot mutasyon olduğu, bu mutasyonu taşıyan hastalarda kliniğin daha ağır, atakların daha sık seyrettiği, kolşisin gereksiniminin daha fazla olduğu ve amiloidoz gelişim riskinin önemli derecede yükseldiği bildirilmiştir (Kıykım ve ark.2000). M694V mutasyonunun homozigot olarak görüldüğü hastalarda amiloidozis ve artrit gibi klinik belirtilerin daha sık oluştuğu bildirilmiştir. Bunun yanında bu hastalarda yüksek ateş, splenomegali ve kronik miyaljinin de sık olduğu belirtilmektedir (Touitou 2001). Ülkemizdeki AAA hastaları arasında V726A mutasyonu frekansı düşük olup, etkili bir mutasyon olmadığı bildirilse de, bu mutasyon varlığında amiloidoz gelişiminin olabileceği de bildirilmiştir (Yeşilada ve ark.2005).

AAA hastalığında sık görülen mutasyonlar arasında sayılan E148Q mutasyonu açısından homozigot veya heterozigot genotipe sahip olan hastalarda, hastanın klinik açıdan asemptomatik olduğu bildirilirken, bu mutasyonun diğer mutasyonlarla birlikte bulunması durumunda klinik belirtilerin ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. E148Q mutasyonunun sadece polimorfik bir varyant olduğu bildirilmektedir (Yalçınkaya ve ark.2002, Medlej-Hashim ve ark.2004, Mansfield ve ark.2001). Ayrıca, E148Q mutasyonunun karmaşık bir allelin parçası olduğu durumlarda hastanın klinik tablosunu ağırlaştırdığı da bildirilmiştir. Çalışmalarda 10. ekzondaki 680 ve 694. kodonlar arasında kalan küçük bir bölgede görülen mutasyonların yüksek frekansta seyrettiği ve hastalığın şiddeti ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Hastalıkta V726A ve E148Q

mutasyonlarından yalnız herhangi birini içeren genotiplerin ve amiloidoz riskinin de düşük frekansta görüldüğü bildirilmiştir. (Touitou, 2001).

2.1.9.Klinik

Hastalık ataklar halinde seyretmekte ve ataklar arası süre her seferinde değişkenlik gösterebilmektedir. Ataklar genellikle 12 saatten uzun ve 72 saatten kısa sürmektedir. Ağır fiziksel ve emosyonel stres, soğuk, menstrüasyon, gebelik ve infeksiyonların atakların tetiklenmesine neden olabileceği bildirilmiştir (Ugan ve ark.2011). Hastalığın klinik tanısı aşağıda belirtilen Tel-Hashomer Kriterlerine göre yapılmaktadır (Livneh ve ark.1997).

Majör kriterler	Minör kriterler	Kesin tanı	Olası Tanı
Poliserözit ile seyreden tekrarlayan ateş atakları	Yineleyen ateşli ataklar	2 majör veya 1 majör + 2 minör kriter	1 majör + 1 minör kriter
Başka bir nedene bağlanamayan AA tipi amiloidoz	Erizipel benzeri eritem		
Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt	Birinci derece akrobada FMF varlığı		

2.1.9.1.Ateş

Hastalarda en sık görülen klinik bulgudur. Genellikle serozit bulgularına eşlik ettiği gibi başlı başına tek semptom da olabilir. Ateş tipik olarak üşüme titreme ile 39-40 °C'ye kadar yükselmekte, tedavisiz olarak 12-36 saat arasında kendiliğinden düşmektedir.

Nadir olarak ateş, AAA'nın tek belirtisi olarak görülebilmektedir. Kolşisin alan hastalarda ataklar ateş olmadan da oluşabilir (Ugan ve ark. 2011, Odabaşı ve ark. 1999).

2.1.9.2. Karın ağrısı

Ateşin dışında en sık görülen semptomlardan biri de karın ağrısıdır. Peritonun inflamasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Genellikle saatler içinde başlayıp tüm kadrana yayılım göstermektedir. Ağrının şiddetli olduğu dönemde karında hassasiyet,

rijidite, defans ve distansiyon gelişmektedir. Peritonitin lokalizasyonuna göre ağrı akut apandisit, renal kolik veya akut kolesistiti taklit edebilir. Karın ağrısı genellikle kendi kendini sınırlar tarzda olup 3 güne kadar uzayabilmektedir (Ugan ve ark. 2011; Odabaşı ve ark. 1999).

2.1.9.3. Göğüs ağrısı

Ailevi Akdeniz Ateşinde plöreziye bağlı oluşan göğüs ağrısının hastaların %25-80'inde görüldüğü bildirilmektedir. Genellikle ağrı tek taraflı, solunumu güçleştiren, hastanın yüzeysel solumasına neden olan göğüs ağrısı şeklindedir. Göğüs ağrısı atakları gösteren hastalarda akciğer grafisinde plevral efüzyon görüldüğü de bildirilmiştir. Bazı hastalarda göğüs ağrısı ataklarına perikardit tablosunda da eşlik ettiği bildirilmektedir. Ayrıca AAA'lı hastaların yaklaşık %0.5'inde ise perikardit görüldüğü bildirilmiştir. (Kees ve ark. 1997, Örün ve Yalçınkaya, 2003).

2.1.9.4. Eklem Tutulumu

Ailevi Akdeniz Ateşinde eklem tutulumu hastaların çoğunda görülen akut veya subakut formda kısa süreli ve bazı hastalarda ise kronik gidişli olan iki farklı şekilde kendini göstermektedir. AAA'da akut eklem tutulumunun daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Eklem tutulumunun 3 karakteristik özelliğinin; a) ilk 24 saatte içinde genellikle artrite çok yüksek ateşin eşlik etmesi, b) genellikle ayak bileği, diz ve kalça gibi alt ekstremitelerde büyük eklemleri tutması, c) şikayetlerin çoğu zaman 24-48 saat içinde pik yapması ve hızla düzelmesidir.

Hastalıkta etiklenen eklem oldukça ağrılı olduğu bildirilmektedir. Kızarıklık ve ısı artışı akut ve şiddetli artrit tablosuna göre daha düşüktür. Sinoviyal sıvı steril olup, görünümü bulanık veya pürülan da olabilmektedir. Bu tip ataklar genellikle 3-5 gün içinde azalmakta, bazen de 1-4 hafta kadar sürebildiği bildirilmektedir. Artritli olguların %6-10'unda ise aylarca sürebilen uzamış artrit tablosu görülebilmektedir. Mono-oligo veya nadiren poliartritle seyreden bu ikinci tip eklem tutulumunda eritem ve lokal ısı artışının az olduğu bildirilmiştir. Hareket kısıtlılığı aylarca sürebilmekte ve komşu eklemlerde atrofi olabilmektedir. Kas enzimleri genelde yükselmemektedir. Böyle uzamış ataklar sırasında, bazen AAA'nın diğer klinik bulgularının eşlik ettiği ataklar da tabloya eklenebilir (Çobankara ve ark. 2011).

2.1.9.5. Erizipel benzeri eritem

AAA için tipik olan yegane döküntüdür. Genellikle alt ekstremitelerde dizin alt kısmında lokalize şekilde görülür. Ayak üzerinde veya ayak bileğinde sık rastlanır. Döküntüler genellikle tek ekstremitede görülür. Lezyonlar genişçe bir sahayı etkileyen keskin sınırlı, kızarıklık, sıcak ve hassas bir cilt bölgesi olarak ortaya çıkar. Eritem 2-3 gün içinde kendiliğinden geçer. Erizipel benzeri eritemli hastaların cilt örneklerinde ödem ve hücrel infiltrasyon görülebilir. AAA'da bildirilen akut epizodik cilt lezyonlarından biri de nodüler lezyonlardır. Bu lezyonlar genellikle 1 cm'den küçüktür. Üstünü örten deri kızarıklık olup kısmen de hassastır. *Eritema nodozum* benzeri erüpsiyon olarak adlandırılmaktadır (Koşan, 2003).

2.1.9.6. Akut Skrotum

Bu klinik tablo genellikle 20 yaşından sonra ve nadiren görülmektedir. Çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sıktır. Ataklar genellikle tek taraflı olup şişlik, kızarıklık, hassasiyet ile kendini belli eder. *Tunica vaginalis*'in inflamasyonundan ileri gelmektedir. Anatomik bir şekil bırakmadan 12-24 saat sonra kendiliğinden geçmektedir. Akut skrotum tek başına veya abdominal atakla birlikte de görülebilmektedir. (Eshel ve ark., 1988, Koşan, 2003).

2.1.9.2. Amiloidoz

Amiloid suda erimeyen, fibriler yapıda anormal bir proteindir. Amiloidoz, amiloidin çeşitli organlarda, ekstrasellüler bölgede ve damar duvarında birikimi sonucu oluşan kronik infiltratif hastalıkların bir grubudur. (Kacar ve ark. 1999). Amiloidoz AAA'nin en ciddi komplikasyonu olup, atakların tipi, şiddeti ve sayısı arasında bir ilişki yoktur. Amiloidoz AAA'nın farklı bir fenotipik özelliğidir ve etnik özellik amiloidoz gelişme sıklığını belirlemektedir. Sefardik Yahudiler ile Türklerin amiloidoz gelişimine Ermeni ve Askenaz Yahudilerinden daha yatkın olduğu bildirilmiştir (Çobankara ve Kiraz, 2000).

Serum Amiloid A'nın (SAA) başta böbrekler olmak üzere, adrenal, bağırsaklar, dalak, akciğer, karaciğer ve testislerde birikmesine bağlı olarak amiloidoz gelişmektedir. Renal amiloidoz kendini proteinüri ile göstermektedir. Amiloidozis vakalarında hasta tedavi edilmediği durumda yaklaşık 7 yıl içinde nefrotik sendromun gelişebileceği ve son dönem böbrek yetersizliğinin oluşabileceği bildirilmektedir. Amiloidozis tanısı için böbrek, cilt altı yağ dokusu, kemik iliği ve rektumdan biyopsiler alınabilir. Fenotip II olarak

gruplandırılan olguların az bir kısmında amiloidoz ilk bulgudur. Bunların bir kısmında amiloidoz geliştikten sonra ataklar başlayabilmektedir. Özellikle böbrek naklinden sonra bu organlarda amiloid birikimi daha belirgin hale gelebilmektedir (Çobankara ve Kiraz, 2000)

Amiloidozisin tanısı esas olarak doku biyopsi materyallerinin mikroskopik olarak incelenmesi ile konur. Bunun yanında serum ve idrarda tayin edilen bazı maddelerin ortaya konulması ile tanı kolayca konabilmektedir. (Kacar ve ark. 1999).

2.1.9.3.Laboratuvar Testleri

AAA hastalığının tanısı için özgün bir laboratuvar testi bulunmamakla birlikte hastalığın tanısında genetik testlerin %75 oranında doğruluğu gösterilmiştir. En önemli laboratuvar bulgusunun ataklar arasında normal seyredip, atak sırasında yükselen sedimentasyon değerlerinin olması, C reaktif protein, serum amiloid A, fibrinojen ve lökosit sayısının yüksekliği, ancak bu parametrelerin de her atakta yükselmeyebileceği de bildirilmektedir. Ataklar sırasında geçici olarak ortaya çıkan hematüri ve proteinüri görülebileceğine dair çalışmalar da mevcuttur (Ugan, 2011).

Tipik periyodik ateş atakları ve 1-4 gün süren serozit, etnik kökeni uygun hastalarda AAA tanısını doğrulamakla birlikte ailede AAA öyküsü ve kolşisine yanıt bu tanıyı daha da desteklemektedir (Ben-Chetrit ve Touitou 2009).

MEFV geninin tanımlanmasından günümüze kadar olan süreçte tanı amaçlı moleküler testlerde hızlı bir artış meydana gelmiştir. Bu yöntemler arasında hastalıktan sorumlu mutasyonların tespitinde PCR temelli moleküler testler yer almaktadır. Klasik olarak hastaların %80'inden sorumlu olduğu bildirilen en yaygın 5 mutasyonun (M680I, M694V, M694I ve E148Q) tespiti ile tipik AAA klinik bulguları ve endemik bölgelerde bulunma tanıda oldukça önemlidir.

Strip Assay, PCR RFLP, ARMS gibi yöntemlerin hastalığa yol açan mutasyonları tespit etmedeki eksiklikleri durumunda MEFV geni dizi analizi yöntemine başvurulması gerektiği bildirilmektedir. Yöntemlere bağlı olarak mutasyonların tespit edilememesi olasılığı düşünüldüğünde, atakların şiddeti ve sıklığında bir azalma olup olmadığını tespit etmek için 4-6 aylık deneme kolşisin tedavisi önemli bir tanı kriteridir. AAA kolşisin tedavisine cevap veren bir hastalık olduğu için, genetik testlere bakılmaksızın, deneme tedavisi tanıyı kuvvetlendirmektedir.

Kolşisin ile tedavi denemesi hem güvenli hem de nispeten ucuz olduğundan, çoğunlukla yetersiz sonuç veren pahalı DNA testlerine başlamadan önce, tanı için tercih edilen bir yaklaşımdır. Bunun yanında proteinüri tespit edilmesi amiloidozis için erken bir işaret olacağı akılda tutulmalı, hastanın ya da ebeveynlerinin hatta yakın akrabalarının en az yılda bir kez rutin idrar tahlili yaptırmaları gerekmektedir (Zadeh ve ark., 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmaya Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına müracaat edip FMF tanısı konmuş hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya 58 (%59.8)'i kadın, 39 (% 40.2)'u erkek olmak üzere toplam 97 hasta ile 42'si kadın, 28'i erkek olmak üzere toplam 70 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Hastaların ve sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması sırasıyla 32.9 ± 12.9 , 30.7 ± 10.2 idi. Çalışma yapılmadan önce Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulu'ndan onay alındı.

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1.Cihaz ve Teknik Malzemeler

1. PCR Cihazı (Thermal cycler, Applied Biosystems, ABD)
2. Santrifüj (NF 048; Nüve, TÜRKİYE)
3. Isı bloğu (Thermo shaker; TS 100, Biosan)
4. Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)
5. UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)
6. DNA Dizi Analizi Cihazı (Applied Biosystems Genetic Analyzer; Hitachi AB, Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130, USA)
7. Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette)

3.1.2.Kimyasal Malzemeler

- 1.PCR Tamponu (Fermentas)
- 2.MgCl₂ (Fermentas)
- 3.Primerler (Fermentas)
- 4.dNTPs (Fermentas)
- 5.Taq DNA (Fermentas)
- 6.Restriksiyon Enzimleri; Hin 1 II, Mva I, BsrDI (Fermentas)
- 7.Marker 50bç ve 100bç (Fermentas)
- 8.Etidyum Bromid (Merck)
- 9.NaCl (Merck)

10. Proteinaz K (Sigma)
11. Etil Alkol (Sigma)
12. Distile su
13. Agaroz (Sigma)
14. Loading Dye (Fermentas)
15. Tris EDTA (Sigma)
16. Sodyum dodesil sülfat (Sigma)
17. Sükröz (Sigma)
18. NaOH (Sigma)
- 19- Triton X-100 (Sigma)
- 20- Borik Asit (Merck)

3.1.3.Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

a. Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7.5, 1 Litre için)

0.32 M Sükröz	= 109.6 g
10 mM Tris-HCl (pH=7,5) Tris-HCl	= 1.2 g
5mM MgCl ₂ MgCl ₂	= 1.0 g
%1 Triton X 100 Triton X- 100	= 10.0 g

Kimyasal maddeler tartılıp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanarak otoklavize edildi (pH = 7.5). Otoklavizasyondan sonra solüsyona Triton X-100 ilavesi yapıldı.

b. Fizyolojik Tampon (pH=7.5, 1 litre için)

0.075 M NaCl	= 4.4 g
0.025 M EDTA	= 9.3 g

Kimyasal maddeler tartılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanarak otoklavize edildi (pH = 7.5).

c. TBE (pH=9, 1 litre için)

500 mM Tris baz	= 60.5 gr
20 mM EDTA	= 7.4 gr
10 mM NaCl	= 0.6 gr

Kimyasal maddeler tartılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanarak otoklavize edildi (pH =9).

d. %10'luk SDS (Sodium Dodesyl Sulfate)

10 g SDS tartıldıktan sonra bidistile su ile son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

e. Proteinaz-K (10mg/ml)

10 gr Proteinaz-K tartılarak tartıldıktan sonra bidistile su ile son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

f. 6 M NaCl, (1 litre için)

321.4 g NaCl tartılarak bidistile su ile son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlandı.

g. TE Tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0.1 mM EDTA (pH=8)

Kimyasal maddeler tartılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanarak otoklavize edildi (pH =8).

h. %70 Etil Alkol Solüsyonu

70 ml absolü etil alkol üzerine 100 ml'ye tamamlanacak şekilde (30 ml) bidistile su ilave edilerek hazırlandı.

3.1.3.2.Elektroforez Analiz Solüsyonları

a. 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

Tris baz (890 mM) 108 g

Borik asit (890 mM) 55 g

EDTA, (0.5 M, 20 mM, pH 8.0) 40 ml

Kimyasal maddeler 900 ml bidistile su içinde çözüldükten sonra pH 8.0'e ayarlanarak 1 litreye tamamlandı (Toplam hacim 1000 ml)

b. 1 X TBE (1 litre için)

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu

900 ml bidistile su

c. Etidyum Bromid Solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum Bromidten 0.1 g tartılarak 10 ml bidistile su içinde çözüldü. Solüsyon tüketilinceye kadar ışık almayacak şekilde koyu bir şişe içinde +4 °C’de muhafaza edildi.

d. DNA Yükleme Tamponu (Loading Buffer)

40 g süzkroz

0.25 g bromfenol mavisi

Kimyasal maddeler tartılarak bidistile su ile 100 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon ependorf tüplerine konarak +4 °C’de muhafaza edildi.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’na müracaat eden ve Tel Hashomer kriterlerine göre (Livneh ve Langevitz, 1997) Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı tanısı konan, akrabalık ilişkisi bulunmayan 97 hasta ile 70 sağlıklı bireyden antikoagülanlı (EDTA) tüplere 5’er ml kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden DNA izolasyonu tuz ile çöktürme yöntemi kullanılarak yapıldı.

3.3. DNA İzolasyonu

Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu için Miller ve arkadaşlarının (Miller 1988) tuz ile çöktürme yöntemi laboratuvar şartlarımıza göre modifiye edilerek kullanıldı.

1. İlk olarak 10 ml’lik steril bir tüpe 1 ml 5x lizis tamponu, üzerine 3 ml bidistile su konup pipetle homojen hale getirildikten sonra bu karışıma tam kan örneğinden 1 ml ilave edilerek tüpün kapağı kapatıldı ve tüp alt-üst edilerek homojen karışım sağlandı.
2. Tüpler buz içinde 10 dakika inkübe edildi.
3. Sonra +4 °C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı.
4. Pellet üzerine 2 ml bidistile su ve 0.5 ml 5x lizis tamponu konup, pipetleme yapılarak pellet çözüldü.

5. Homojenize edilen tüp +4 °C' de 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Çökelti üzerine 1 ml %10 SDS ve 20 mg/ml'lik proteinaz-K'dan 2.5 µl konup köpük oluşmamasına dikkat edilerek pipetaj yapıldı.
7. Tüpler inkübatörde 65 °C'de ara sıra hafifçe çalkalanarak 15 dakika inkübe edildi.
8. Karışım ependorf tüplere alınarak buz içinde 5 dakika inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda tüplere 300 µl doymuş (sature, 6N) NaCl ilave edildikten sonra vortekslenerek homojenize edildi.
10. Ependorf tüpler buz içinde 5 dakika tutuldu.
11. Sonra +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, supernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
12. Tüplere 0.5 ml, 24:1 kloroform/izoamil alkol karışımı kondu ve tüp iyice çalkalanarak karışım homojen hale getirildi.
13. Homojenizasyon işlemi takiben tüpler yeniden +4 °C'de 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
14. Süpernatant dikkatli bir şekilde 2 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
15. Üzerine 1 ml absöü etil alkol konularak tüpler 8-10 kez alt-üst edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Bu aşamada genomic DNA yumak şeklinde görüldü.
16. Presipite edilen DNA +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve alkol uzaklaştırıldı.
17. Sonra tüplere 1 ml % 70 etil alkol konularak, tüp alt-üst edildi.
18. +4 °C'de 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra tüpler ters çevrilerek alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
19. Tüplere 200'er µl steril bidistile su konuldu ve DNA'nın tamamen çözülmesi ve DNaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 75 °C'de 10 dk tutuldu.

3.4. PCR-RFLP Yöntemi ile Fas -670 A/G ve FasL -844 T/C Gen Polimorfizminin Belirlenmesi

Fas -670 A/G ve FasL -844 T/C gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için aşağıda (Çizelge 3.1.) nükleotid dizileri verilen primer çiftleri kullanılarak PCR-RFLP tekniği uygulandı. PCR optimizasyonu için öncelikle çizelge 1 ve 2'de verilen PCR miksleri ve amplifikasyon

döngüleri seçildi. Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek PCR ürünleri jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

Çizelge 3.1. Primer dizileri ve amplifiye ürünlerin PCR büyüklükleri.

Gen	Primer	Primer dizileri (5'-3')	PCR ürünlerinin büyüklüğü
Fas -670 A/G	F	5'-CTA CCT AAG AGC TAT CTA CCG TTC-3'	233 bç
	R	5'-GGC TGT CCA TGT TGT GGC TGC-3'	
FasL -844 T/C	F	5'-CAG CTA CTC GGA GGC CAA G-3'	401 bç
	R	5'- GCT CTG AGG GGA GAG ACC AT-3'	

Çizelge 3.2. Fas -670 A/G ve FasL -844 T/C gen polimorfizmleri için amplifikasyonun gerçekleştirildiği reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılacak Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10X PCR tamponu	5	1X
Forward primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Reverse primer (5 pmol/µl)	1	5 pmol
Deoksi NTPs (25 mM)	0.4	0.2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1.5	1.5 mM
Genomik DNA (50 ng/µl)	1	100 ng
Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 0.2		1 U
Steril bidistile su	39.9	
Total Hacim	50 µl	

Çizelge 3.3. Fas gen -670 A/G polimorfizmi için PCR program

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Initial (ilk denatürasyon)	94	3 dk.	1
Denatürasyon	94	1 dk.	40
Annealing (bağlanma)	58	1 dk.	
Extension (uzama)	72	2 dk.	
Final extension (son uzama)	72	10 dk.	1

Çizelge 3.4. FasL gen -844 T/C polimorfizmi için PCR programı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Initial (ilk denatürasyon)	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	35
Annealing (primer bağlanması)	62	30 sn.	
Extension (zincir uzaması)	72	45 sn.	
Final extension (son uzama)	72	7 dk.	1

3.5. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi Maniatis ve arkadaşlarının (Maniatis ve Fritsch,1982) tarif ettiği gibi aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- Elektroforez için 2 g agaroz tartılarak 0.5x TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Agaroz mikrodalga fırında ısı yardımıyla çözüldü, 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 3 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklendi.
- Sonra çözelti jel dökme kaplarına dökülerek uç kısımdan 1 cm kadar uzaklığa, uygun taraklar yerleştirilerek soğumaya bırakıldı.
- Yaklaşık 30 dakika agarozun polimerizasyonu için bekletildi.
- Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.

- Jeldeki açılmış olan kuyucuklara 10'ar µl miktarlarda sırasıyla DNA marker ve PCR ürünleri (yükleme solüsyonu içinde) yüklendi.
- Elektroforez işlemi başlatılarak (100-150 volt/ 30-60 dk) amplifikasyon ürünlerinin elektrik akımı sayesinde yürütülmesi yapıldı.
- Yürütme işlemi sonunda oluşan bantlar jel görüntüleme cihazında görüntülendi. Amplifikasyon işleminden sonra ürünlerin restriksiyon enzimleriyle kesimleri yapıldı.

Fas geni -670 A/G polimorfizminin belirlenmesi için MvaI, FasL -844 T/C polimorfizminin belirlenmesi için ise BsrDI restriksiyon enzimleri kullanıldı.

Kesim işlemi için kesim karışımı aşağıdaki çizelgede verildiği formüle göre yapıldı.

Çizelge 3.5. Fas geni -670 A/G ve FasL geni -844 T/C polimorfizmlerinin kesim reaksiyon karışımları.

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Amplifiye ürün (PCR ürünü)	5
Steril bidistile su	13
10xTampon	1.5
Restriksiyon enzimi (10 U/µl)	0.5

Çizelge 4'deki karışımları içeren tüpler, Fas geni -670 A/G polimorfizmi için 37 °C'de, Fas L geni -844 T/C polimorfizmi için ise 55 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kesim ürünleri %3'lük agaroz jel hazırlanarak elektroforez işlemine tabii tutuldu. Elektroforez işlemi takiben jel görüntüleme cihazı yardımıyla oluşan kesim ürünleri görüntülendi.

Çizelge 3.6. Fas-FasLPCR ürünlerinin sırasıyla *MvaI*(*BstNI* ve *BsrDI*(*BseMI*) enzimleriyle kesimi sonucu oluşan ürün boyları

Polimorfizm	Primer Dizisi	Ürün büyüklüğü	<i>MvaI</i> (<i>BstNI</i>) ve <i>BsrDI</i> (<i>BseMI</i>) enzimleriyle kesimi sonrası ürün boyları
Fas -670 A/G	5'-CTA CCT AAG AGC TAT CTA CCG TTC-3'	233 bç	AA:233-99
	5'-GGC TGT CCA TGT TGT GGC TGC-3'		GG:189-99-44 AG:233-189-99-44
FasL -844 T/C	5'-CAG CTA CTC GGA GGC CAA G-3'	401 bç	TT:401
	5'- GCT CTG AGG GGA GAG ACC AT-3'		CC:233-168 TC:401-233-168

3.6. MEFV Gen Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi Tekniği ile Belirlenmesi

Genomik DNA Hazırlanması

Dizi analizi için her hastadan 20 ng/µl DNA örneği kullanıldı.

PCR Amplifikasyonu

- Aşağıdaki çizelge kullanılarak PCR amplifikasyon karışımları hazırlandı

Çizelge 3.7. PCR amplifikasyon karışımları

Bileşen	Miktar µl
AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (2X)	12.5
Forward Primer	2.0
Reverse Primer	2.0
DMSO	2.0
Distile su	4.0
Genomik DNA (5-20 ng/µl)	2.5
Toplam	25

- Hazırlanan karışım 0.2 ml'lik ependorf tüplerine dağıtıldı.
- Reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde ayarlandı.
- Cihazda 9600 emülasyon modülü (emulation module) seçilerek amplifikasyon işlemine geçildi.

Hazırlanan karışımlar thermal cycler cihazında aşağıda belirtilen program seçilerek PCR işlemi gerçekleştirildi.

95°C -----10 dak.
 95 °C-----30 sn.
 60 °C-----1.5 dak. } 40 döngü
 72 °C-----1 dak.
 72 °C-----7 dak
 +4 °C----- ~

Amplifikasyon işleminden sonra ürünler %2' lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

DNA Dizileme İşlemi

Aşağıdaki çizelgede belirtildiği gibi karışım hazırlandı.

Çizelge 3.8. DNA dizileme karışımı

Bileşen	Miktar (µl)
İşaretli boya v3.1 Kit	2.0
5x Sequencing Buffer	2.0
Primerler (Forward ve Reverse)	2.0
PCR amplifikasyon ürünü	2.0
Bidistile su	2.0
Toplam hacim	10.0

Karışım hazırlandıktan sonra dizileme işlemine derhal geçildi.

Hazırlanan karışımlar aşağıdaki döngülerde amplifiye edildi.

Çizelge 3.9. DNA Dizilemede Amplifikasyon döngüleri.

Aşama	Tanım	Isı (°C)	Süre
1	Aktivasyon	96	1 dakika
2	Amplifikasyon	96	10 Saniye
	25 siklus	50	5 Saniye
		60	4 dakika
3	Bekleme	4	-

- Reaksiyon hacmi 10 µl olarak ayarlandı.
- Cihazda 9600 emülsiyon modülü seçilerek analiz işlemi gerçekleştirildi.

Amplifikasyon Ürünlerinin Pürifikasyonu

- Pürifikasyon işlemi için 1 g Sephadex 14 ml distile su içinde çözülerek 30 dakika arasına çalkalanarak oda ısısında inkübe edildi.
- Sonra karışım Sephadex kolonlarına 600'er µl dağıtıldı.
- Kolonlar 2000 g de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası Sephadexli kolonlar başka tüplere alındı.
- Sonra 10 µl Cycle Sequencing ürünü Sephadex'in üzerine kolona temas ettirilmeden konuldu.
- Kolonlar 2000 g de 2 dakika santrifüj edildi.
- Kolonların altında sızan ürün pürifiye ürün olup dizi analizinde kullanıldı (yüklenen ürün miktarı 10 µl'den az ise üzeri distile su ile 15 µl'ye tamamlanarak cihaza yüklendi).

Sonuçların Değerlendirilmesi

Sekans değerlendirme işlemi Sequencing Analysis, SeqScape ve BioEdit software ile mutasyon tabloları kullanılarak yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın istatistiksel analizleri için SPSS 16 programı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılmasında Fisher's Exact Test, hastaların klinik bulgularıyla genotiplerin karşılaştırılması için ise X^2 testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında klinik olarak AAA tanısı konulmuş 97 hasta dahil edildi. Fas geni -670 A/G ve FasL geni -844 T/C polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi ile, MEFV geninin 2. ve 10. ekzon mutasyonları ise sekans analizi tekniği ile incelendi. Hastaların %59.7 (58/97)'si kadın, %40.2 (39/97)'si erkek, kontrol grubunun ise % 60(42/70)'ı kadın, %40 (28/70)'ı erkeklerden oluşmaktaydı. Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalaması ise sırasıyla 32.9 ve 30.7 yıl idi.

Hastaların demografik bulguları incelendiğinde, kadın hastaların erkek hastalara oranının 1.5, hastaların tamamı göz önüne alındığında hastalık başlangıç yaşının; 17.1±11.9, tanı konulma yaşının; 29.2±13.8 olduğu tespit edilirken, hastalık başlangıcı ile tanı yaşları arasında geçen sürenin ise (yıl olarak tanıdaki gecikme) 12.5±11.9 olduğu saptandı. Çalışmada hastaların %49.5 (48/97)'unun ailesinde AAA hastalığı öyküsü olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) hastalarının demografik bulguları.

Yaş ortalaması (yıl)	32.9±13.9
Kadın/Erkek oranı (yıl)	58:39 (1.48)
Hastalık başlangıç yaşı (yıl)	17.1±11.9
Tanı yaşı (yıl)	29.2±13.8
Tanıda gecikme (yıl)	12.45±11.9
Hastalık öyküsü	48/97

Çalışmaya dahil edilen hastaların hastaların %90.7'sinde karın ağrısı, %60.2'sinde ateş, %75.7'sinde eklem ağrısı, %66.9'unda kas ağrısı, %56.3'ünde göğüs ağrısı ve %10.7'sinde erizipel benzeri döküntülerin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının klinik bulguları.

Klinik Bulgular	%
Karın ağrısı	90.7
Eklem ağrısı	75.7
Kas ağrısı	66.9
Ateş	60.2
Göğüs ağrısı	56.3
Erizipel benzeri döküntü	10.7

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T/C genotipleri Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. AAA hastalarında Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T/C genotiplerinin dağılımı.

Sayı	Cinsiyeti	FasL -844 T/C	Fas -670 A/G
1	K	CC	AG
2	E	TC	AG
3	E	TC	AA
4	K	CC	AG
5	E	CC	AA
6	K	TC	AG
7	K	TC	GG
8	K	TC	AA
9	K	TT	AG
0	K	TC	AG
11	E	TC	AA
12	E	TC	AA
13	E	TT	AA
14	K	TT	GG
15	E	TC	AA

Çizelge4.3.ün devamı			
16	K	TC	AA
17	E	TC	AG
18	K	TT	AA
19	E	TT	AA
20	K	TC	AG
21	K	TC	GG
22	K	TT	AA
23	K	CC	AA
24	K	TT	AG
25	K	TT	GG
26	E	TC	AG
27	K	TC	AA
28	K	TC	AA
29	K	TT	GG
30	E	TT	AG
31	E	TC	GG
32	E	TT	GG
33	E	TC	AA
34	E	TC	GG
35	E	TC	AG
36	E	TT	AA
37	E	TT	GG
38	K	CC	AG
39	E	TC	GG
40	K	TC	AA
41	K	CC	AG
42	E	CC	AA
43	E	CC	AA
44	E	TC	AA

Çizelge4.3.ün devamı			
45	K	CC	AA
46	K	TC	AA
47	E	TT	GG
48	K	TC	AG
49	K	TT	GG
50	E	TC	AA
51	K	TT	GG
52	E	CC	AG
53	K	TC	GG
54	K	TT	AG
55	K	TC	AA
56	K	CC	AG
57	K	TT	AG
58	K	CC	AG
59	K	TT	AA
60	K	TC	AG
61	E	TC	GG
62	K	TC	GG
63	K	CC	AA
64	K	TC	AA
65	E	TC	AG
66	K	TC	AG
67	E	TC	AA
68	K	CC	AG
69	K	CC	AG
70	K	TT	AG
71	K	TC	AG
72	E	CC	GG
73	K	TT	AA
74	E	TC	AG

Çizelge4.3.ün devamı			
75	K	TC	AG
76	K	TC	AG
77	K	CC	GG
78	K	TC	AA
79	E	CC	GG
80	E	CC	GG
81	K	CC	AA
82	K	TT	AG
83	E	CC	GG
84	K	TC	GG
85	E	TC	AG
86	K	TC	AG
87	K	TC	AG
88	K	TC	AA
89	E	TC	GG
90	E	CC	GG
91	E	TT	AG
92	K	TC	GG
93	E	TC	AA
94	K	TC	AA
95	E	TC	AG
96	K	CC	AG
97	K	TC	GG

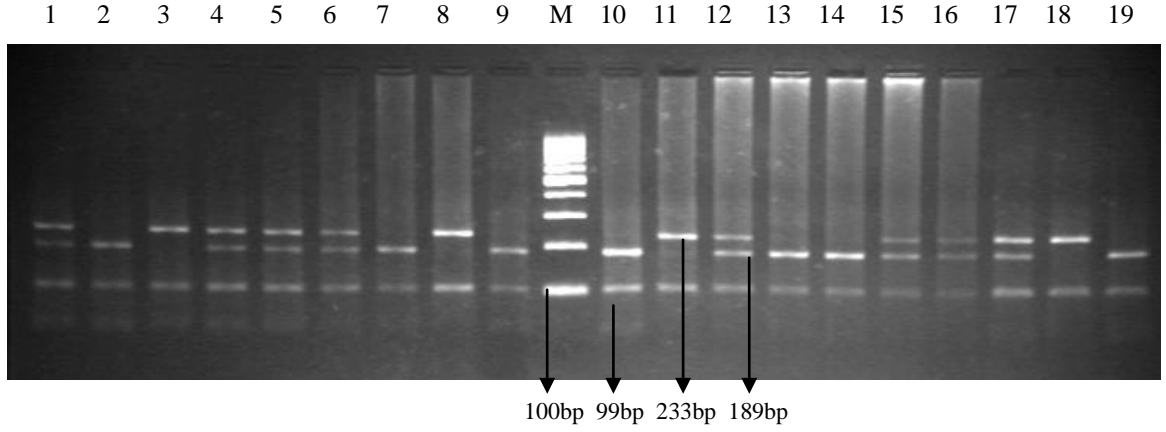
Çizelge 4.4. . Kontrol grubunda Fas gen -670 A/G ve FasL gen -844 T/C genotiplerinin dağılımı.

Sayı	Cinsi yeti	Fas -844 T/C	Fas -670 /G
1	E	TC	AA
2	K	TC	AG
3	E	CC	GG
4	E	CC	AG
5	E	CC	AA
6	K	CC	GG
7	K	TC	AG
8	K	TC	AG
9	K	CC	AG
10	E	TC	AG
11	K	TC	AG
12	K	TC	AG
13	E	TC	AG
14	K	CC	AG
15	K	TC	AA
16	E	TC	AA
17	E	TT	AA
18	K	TT	GG
19	K	TC	GG
20	K	TC	AA
21	E	TC	AG
22	K	TC	AG
23	E	TC	AA
24	E	TC	AG
25	E	TT	AG

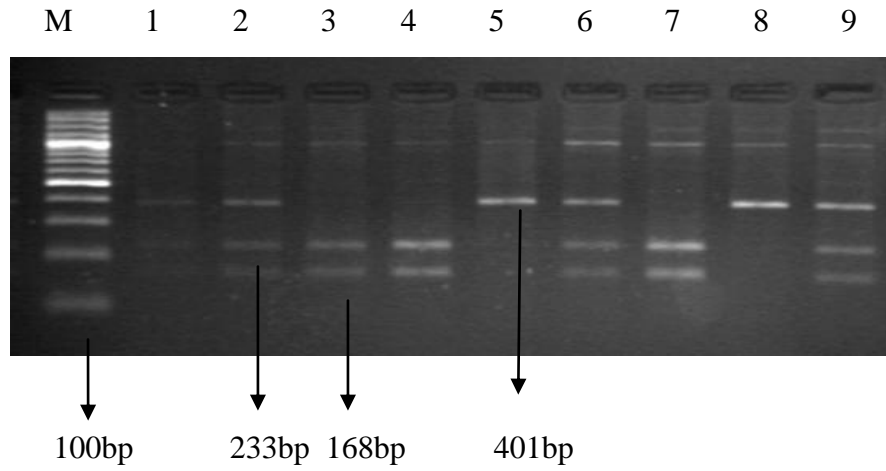
Çizelge4.4.ün devamı			
26	E	TC	AG
27	K	TC	AG
28	E	TC	AA
29	E	TC	AG
30	K	TC	AA
31	K	TC	AA
32	K	TC	AG
33	K	TC	AA
34	K	TC	AG
35	K	TC	AG
36	K	TC	AG
37	K	TC	AA
38	K	TT	AA
39	K	TC	AG
40	K	TC	GG
41	K	TC	AA
42	E	TC	AG
43	E	TC	AA
44	K	TC	GG
45	E	TC	AG
46	E	TC	AG
47	K	TC	GG
48	K	TC	AG
49	E	TC	AA
50	K	TC	AG
51	K	CC	AA
52	K	CC	AA
53	E	TC	AA
54	K	TT	AG
55	K	TT	AA

Çizelge4.4.ün devamı			
56	E	TC	AG
57	E	TC	AA
58	E	TC	GG
59	K	TC	AA
60	E	TC	GG
61	E	CC	GG
62	K	TC	AG
63	E	TC	AG
64	K	TC	GG
65	K	TC	AA
66	K	TT	AG
67	K	TT	AA
68	E	CC	GG
69	K	TC	AA
70	K	TT	AG

Bazı hastalara ait Fas gen -670 AA, AG ve GG genotiplerinin elektroforez görüntüsü şekil 1’de, FasL geni -844 TT, TC ve CC genotiplerinin elektroforez görüntüsü ise Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Fas geni -670 A/G polimorfizminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M:Marker (100bp ladder); 3, 8, 11 ve 18. sıradaki hastalar normal (AA genotipi), 1, 4, 5, 6, 12, 15, 16 ve 17. sıradaki hastalar heterozigot (AG genotipi), 2, 7, 9, 10, 13, 14 ve 19. sıradaki hastalar homozigot mutant (GG).



Şekil 4.2. FasL geni -844 T/C polimorfizminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M:Marker (100bp ladder). 5. ve 8. sıradaki hastalar normal (TT); 1, 2, 6 ve 9. sıradakiler heterozigot (TC); 3, 4 ve 7. sıradaki hastalar homozigot mutant (CC).

Fas gen -670 genotip ve allel frekansları incelendiğinde, 97 AAA hastasının 34'ünde (%35.1) AA, 37'sinde(%38.2) AG ve 26'sında (%26.8) GG genotipi, sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 70 sağlıklı bireyin ise 25'inde (%35.7) AA, 32'sinde (%45.7) AG ve 13'ünde (%18.6) GG genotipi saptanmıştır. A ve G allellerinin frekansları ise

sırasıyla AAA hastalarında %52.6 ve %47.4, sağlıklı kontrol grubunda %58.6 ve %41.4 olarak bulundu. Çizelge 4.7' de görüldüğü gibi her iki grupta genotip ve allel frekansları benzer olup, gruplar arasında gerek genotip ve gerekse allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$).

FasL gen -844 genotip ve allel frekansları ele alındığında ise Çizelge 4.7' de görüldüğü gibi, AAA hasta grubunda TT, TC ve CC genotiplerine sahip olanların sayıları sırasıyla 23 (%23.7), 51 (%52.6) ve 23 (%23.7), kontrol grubunun ise 9 (%12.9), 51 (%72.9) ve 10 (%14.3) olarak saptandı. T ve C allelelerinin sıklığı ise sırasıyla, hasta grubunda %50 ve %50, kontrol grubunda ise % 49.3 ve % 50.7 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda TC genotipi sıklığı, hasta grubuna göre oldukça yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Göreceli Risk: GR: 0.413, $P=0.01$). Hasta grubunda CC genotipi sıklığı kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı (GR: 1.865, $P= 0.169$).

Haplotip dağılımları incelendiğinde ise, AAA grubunda -670A/-844C haplotipi %27.9, -670G/-844C haplotipi % 22.1, -670A/-844T haplotipi %26.2 ve -670G/-844T haplotipi % 23.8 olarak bulunurken, kontrol grubunda ise -670A/-844C haplotipi %24.6, -670G/-844C haplotipi %26.1, -670A/-844T haplotipi 33.9 ve -670G/-844T haplotipi %15.3 olarak tespit edilmiştir. -670G/-844T haplotipi sıklığı hasta grubunda (%26.1), kontrol grubuna göre (%15.3) yüksek olmakla birlikte birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasında diğer üç haplotipin sıklığı açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.3. Ailevi Akdeniz ateşi hastaları ve kontrol grubu arasında Fas geni -670 A/G ve FasL geni -844 T/C polimorfizminin genotip, allel ve haplotip frekanslarının karşılaştırılması.

Genotip /Allel/ Haplotip	Kontrol (n=70)	AAA (n=97)	X²	GR (%95 GA)	P
Fas-670 A/G					
Genotip frekansı					
AA	25 (%35.71)	34 (%35.05)	0.008	0.971 (0.511-1.847)	1.000
AG	32 (%45.71)	37 (%38.15)	0.961	0.732 (0.392-1.366)	0.344
GG	13 (%18.57)	26 (%26.80)	1.540	1.606 (0.757-3.404)	0.267
Allel frekansı					
A	82 (%58.57)	105 (%52.58)	0.607	0.839 (0.539-1.305)	0.500
G	58 (%41.43)	89 (%47.42)	0.607	1.192 (0.766-1.855)	0.500
FasL -844 T/C					
Genotip frekansı					
TT	9 (%12.85)	23 (%23.71)	3.092	2.107 (0.908-4.889)	0.110
TC	51 (%72.85)	51 (%52.58)	7.034	0.413 (0.213-0.800)	0.010
CC	10 (%14.30)	23 (%23.71)	2.278	1.865 (0.824-4.220)	0.169
Allel frekansı					
T	69 (%49.28)	97 (%50.00)	0.017	1.029 (0.666-1.589)	0.912
C	71 (%50.72)	97 (%50.00)	0.017	0.972 (0.629-1.501)	0.912
Haplotip frekansı					
-670 A/-844 C	34.48 (%24.60)	54.14 (%27.90)	0.448	1.185 (0.721-1.946)	0.503
-670 G/-844 C	36.52 (%26.10)	42.86 (%22.10)	0.715	0.804 (0.484-1.335)	0.397
-670 A/ -844 T	47.52 (%33.90)	50.86 (%26.20)	2.336	0.692 (0.430-1.111)	0.126
-670 G/-844 T	21.48 (%15.30)	46.14 (%23.80)	3.587	1.722 (0.977-3.032)	0.058

*AAA, ailevi Akdeniz ateşi; X², Ki-kare; GR, göreceli risk; GA, güven aralığı

Çizelge 4.8' de hastaların klinik bulgularına göre polimorfizmlerin dağılımları verilmiştir. Hastaların klinik bulguları ile Fas gen -670 ve FasL gen -844 genotipleri karşılaştırıldığında, hastaların klinik bulgularıyla çalışılan genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (P>0.05).

Çizelge 4.4. AAA hastalarının klinik bulgularına göre Fas ve FasL genotiplerin dağılımı.

Genotipler	Fas -670 A/G			FasL -844 T/C			P
	AA	AG	GG	TT	TC	CC	
Klinik Bulgular (%)							>0.05
Ateş	64.2	66.6	100.0	87.5	66.6	55.5	>0.05
Karın Ağrısı	92.8	88.8	88.8	100.0	83.3	100.0	>0.05
Eklem Ağrısı	92.8	77.7	88.8	87.5	72.2	88.8	>0.05
Göğüs Ağrısı	64.2	77.7	33.3	50.0	66.6	55.5	>0.05
Kas ağrısı	78.5	88.8	66.6	62.5	72.2	88.8	>0.05
Erizipel döküntü	14.2	2.0	0.0	0.0	16.6	11.1	>0.05

Çalışmamızda 97 hastanın 92'sinde MEFV gen mutasyonu bakılabilmektedir. Yaptığımız mutasyon analizi sonucu çalışmaya aldığımız 92 hastanın 71'inde (%77.17) mutasyon saptanmıştır Çizelge 4.6.da görüldüğü gibi, MEFV geninin 2. ve 10. ekzonunda saptadığımız mutasyonlar göz önüne alındığında, hastalarımızda 10 farklı mutasyon ve 23 farklı genotip belirlenmiştir. 92 hasta içinde aynı mutasyon tipini her iki allelde de bulduran (homozigot) hasta sayısı 14 (%15.22), mutasyonların farklı kombinasyonlarını birleşik heterozigot halde bulduran hasta sayısı 16 (%17.39), heterozigot hasta sayısı 34 (%36.96), kompleks genotipe sahip hasta sayısı ise 6 (%6.52) olarak belirlendi. 21 hastada (%22.83) çalışılan 2. ve 10. ekzon mutasyonlarından hiçbirisi saptanamadı. Mutasyon frekanslarını allel düzeyinde incelediğimizde, 184 bağımsız MEFV allelinin 118'inde (%64.12) mutasyon bulunmuştur (Çizelge 4.6). Çalışmamızda en sık görülen mutasyon R202Q mutasyonu olup bağımsız allellerin %21.20'sinde mevcuttur. E148Q mutasyonu bağımsız allellerin %16.30'unda, M694V %11.41'inde, M694I %4.89'unda, V726A %4.89'unda, M680I %2.17'sinde saptanmış olup bunu A744S(%1.09), E230K (%1.09), K695R (%0.54) ve R761H (0.54) mutasyonları takip etmektedir(Çizelge 4.5.). Çalışmamızda ayrıca, mutasyon analizi yapılan 92 hastanın 53'ünde MEFV geninin 2. ekzonu (G138G, A165A, D102D, P124P) ve 10 ekzonunda (P706P) tek nükleotid polimorfizmi olarak bilinen ve hastalığın kliniğini etkilemeyen sessiz genetik varyantlar da tespit edilmiştir. Bu polimorfizmler genellikle diğer MEFV mutasyonları ile birlikte kompleks halde bulunmaktadır.

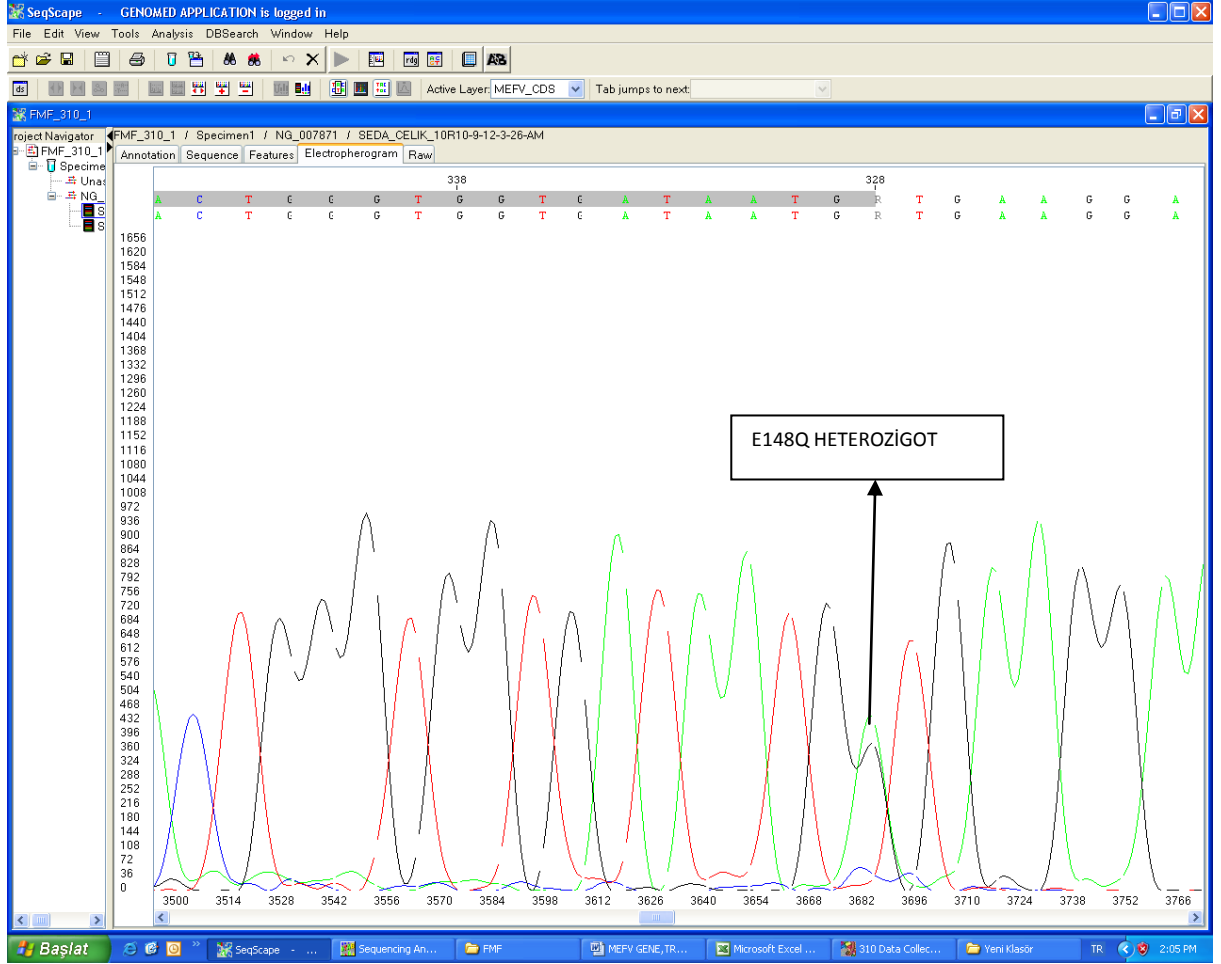
Çizelge 4.5. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında MEFV geni 2. ve 10. ekzon mutasyonlarının allel dağılımları

Mutasyon tipi	Allel sayısı	Frekans (%)
R202Q	39	21.20
E148Q	30	16.30
M694V	21	11.41
M694I	9	4.89
V726A	9	4.89
M680I	4	2.17
A744S	2	1.09
E230K	2	1.09
K695R	1	0.54
R761H	1	0.54
Polimorfik varyant* ya da bilinmeyenler	66	35.87

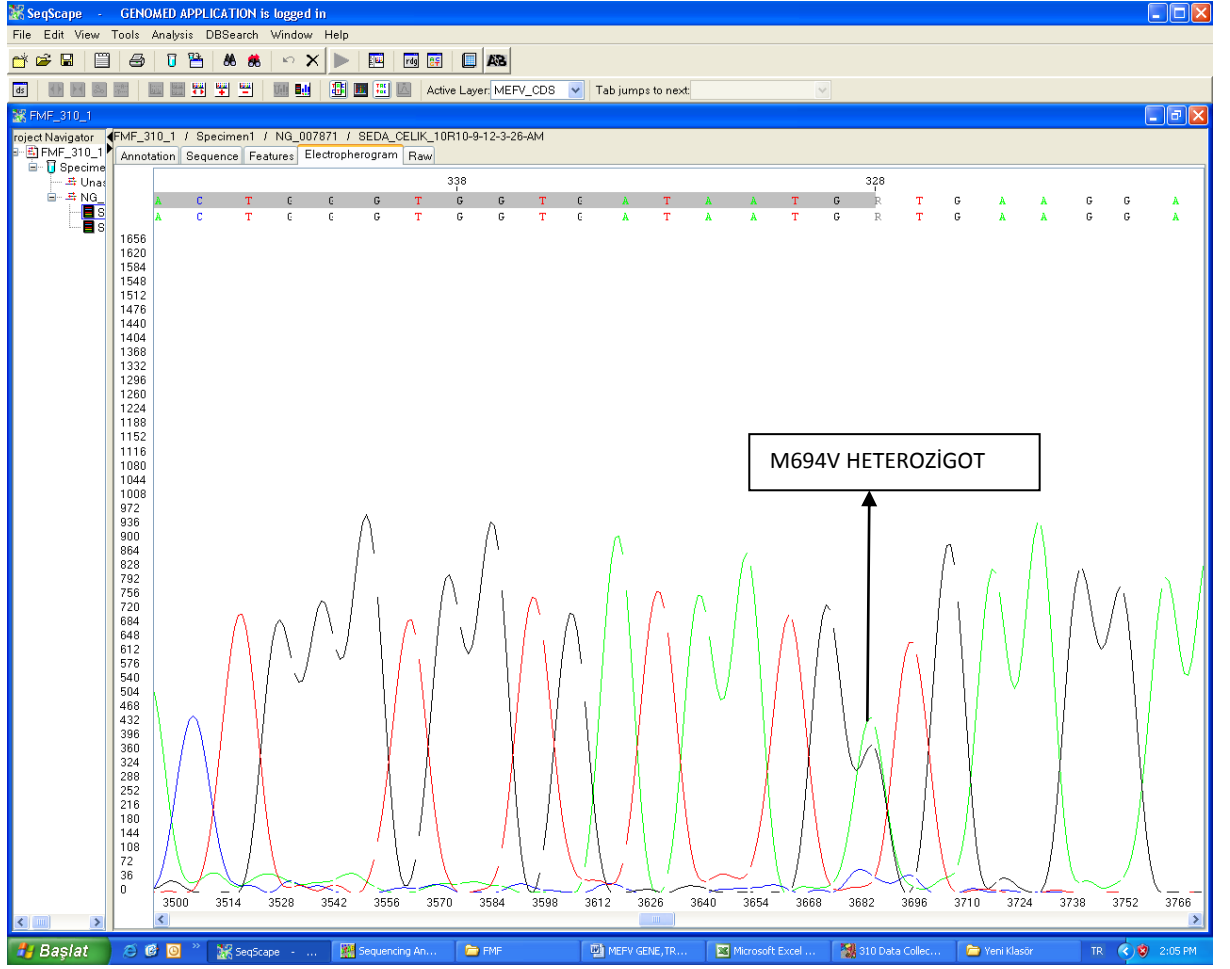
Çizelge4.6. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında MEFV geni 2.ve 10.ekzon mutasyonlarının genotip dağılımları

Mutasyon	Genotip	Hasta sayısı	Genotip frekansı (%)
Homozigot	R202Q/R202Q	5	5.43
	M694V/M694V	3	3.26
	M694I/M694I	3	3.26
	E148Q/E148Q	2	2.17
	M680I/M680I	1	1.10
Heterozigot	E148Q	14	15.21
	R202Q	11	11.95
	V726A	4	4.34
	A744S	2	2.17
	M680I	1	1.10
	M694V	1	1.10
	E230K	1	1.10
Birleşik heterozigot	E148Q/R202Q	5	5.43
	E148Q/M694V	3	3.26
	M694I/V726A	2	2.17
	E148Q/V726A	1	1.10
	R202Q/M694V	1	1.10
	E148Q/V726A	1	1.10
	E148Q/K695R	1	1.10
	M694I/R761H	1	1.10
	E148Q/M680I	1	1.10
Kompleks genotip	M694V/M694V/R202Q/R202Q	4	5.43
	E230K/E148Q/R202Q	1	1.10
	R202Q/M694V/V726A	1	1.10
Mutasyon saptanan hasta sayısı		71	77.17
Mutasyon saptanamayan hasta sayısı		21	22.83
Toplam hasta sayısı		92	100

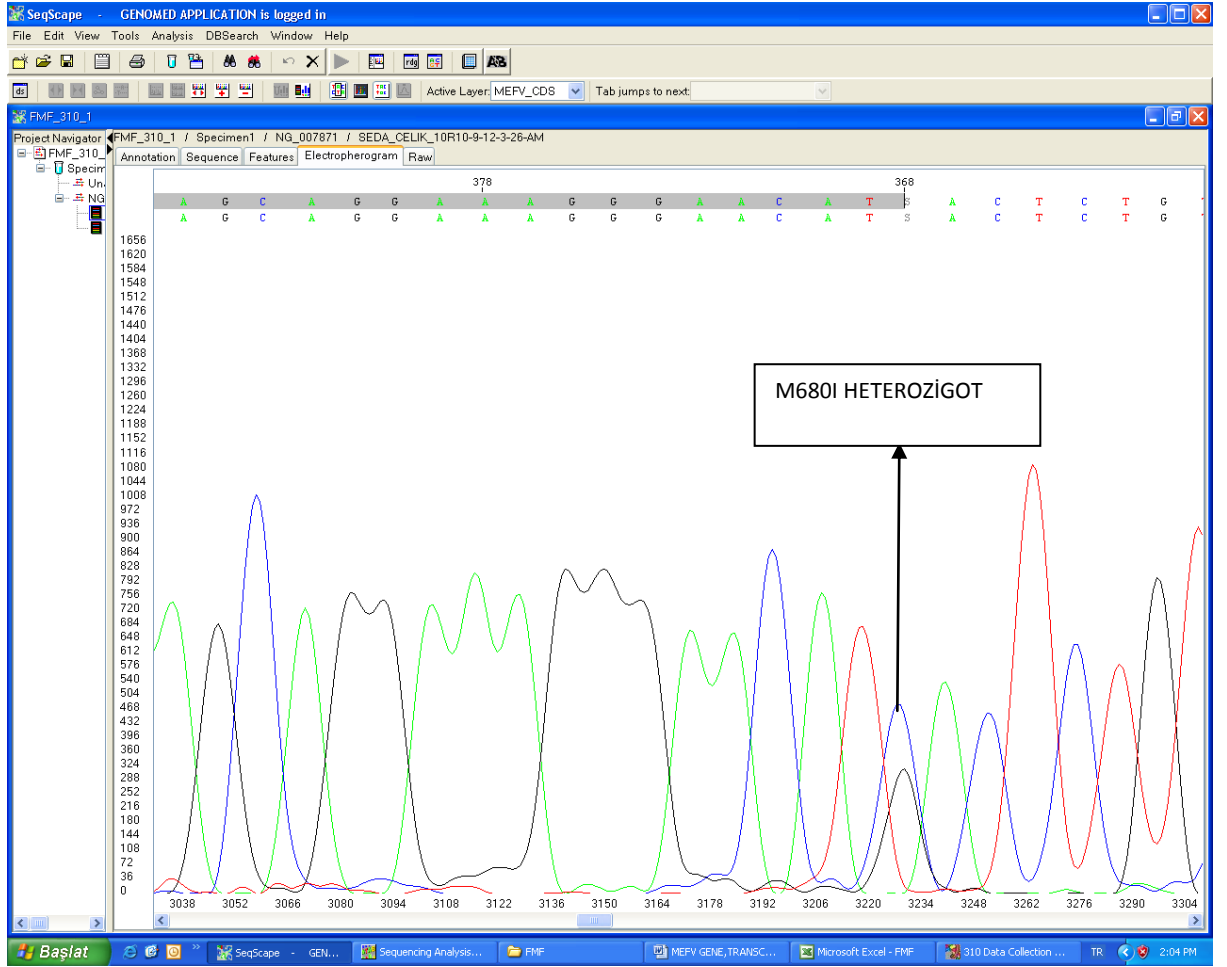
Aşağıdaki şekillerde rastgele seçilmiş bazı hastalara ait E148Q, M694V, M680I ve V726A heterozigot mutasyonlarının sekans elektroferogramları görülmektedir



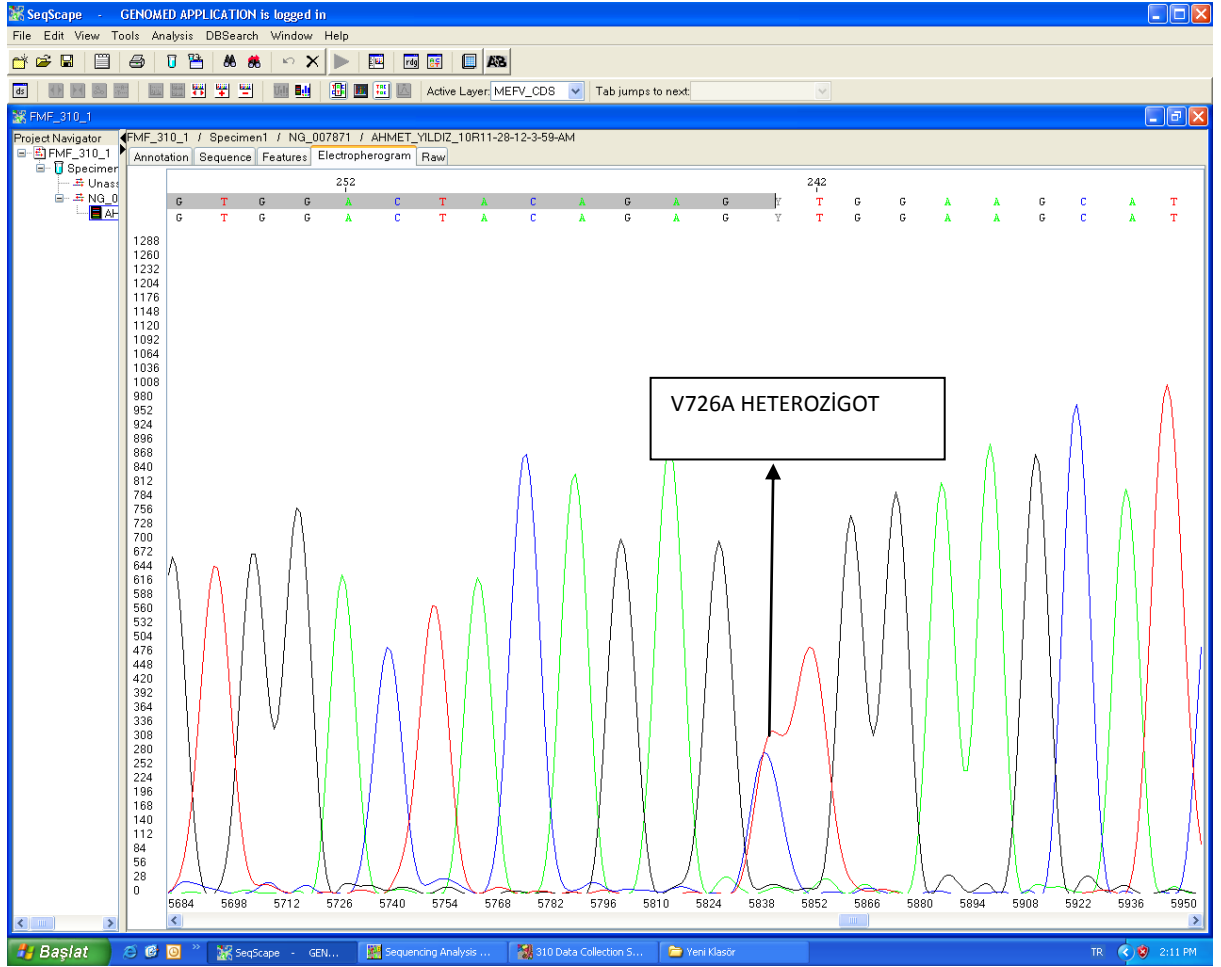
Şekil 4.3. E148Q heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü.



Şekil 4.4. M694V heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü.



Şekil 4.5. M680I heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü.



Şekil 4.6. V726A heterozigot mutasyonunun dizi analizi görüntüsü

5.TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı genellikle Doğu Akdeniz ülkelerinde kendini sınırlayan ataklar halinde görülen ateş, karın ve eklem ağrısı, göğüs bölgesinde ağrı şeklinde ortaya çıkan kalıtsal otoinflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın en önemli komplikasyonu ise böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilen amiloidozis gelişmesidir. (Lightroof 1993, Shohat and Halpern 2011). Dünya genelinde 100.000'den fazla AAA hastasının olduğu tahmin edilmektedir. AAA, otozomal resesif olarak aktarılıp, çoğunlukla Yahudiler, Türkler, Araplar ve Ermeniler gibi Akdeniz bölgesinde yaşayan toplumlari etkilemektedir. Türkler ve Yahudi toplumlarında taşıyıcılığın %20, Ermeniler arasında ise %15 dolaylarında olduğu, Aşkenaz Yahudileri arasında ise bu oranın %10'un aşağılarına kadar indiği bildirilmektedir (Önen 2006). Bazı çalışmalarda hastalığın erkekler arasında daha yaygın olduğu tespit edilse de, hastalığın her iki cinsi de benzer oranlarda etkileyebileceği bildirilmektedir. Çalışmamızda ise hastaların 39'u erkek, 58'i kadın olup erkek-kadın oranı 0.67 olarak bulunmuştur, yani çalışmamızda kadın hasta oranı erkeklere göre daha yüksektir. Bu da çalışmadaki toplam hasta sayısının yetersizliğinden kaynaklanabilir. Hastaların çoğunda (yaklaşık %90'ında) hastalığa ilişkin ilk şikayetlerin 20 yaşından önce ortaya çıktığı, şikayetlerin 6-96 saat aralığında devam eden AAA ataklarıyla şekillendiği ve kendiliğinden azaldığı bildirilmektedir (Zonios ve ark. 2007). AAA hastalığı MEFV genindeki mutasyonlar sebebiyle oluşmaktadır. Bu gen 10 ekzondan oluşmakta olup temel olarak granulositlerde sentezlenen pririn veya marenostirin olarak bilinen 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Ayrıca bu genin inflamasyonun negatif regülatörü olduğu da düşünülmektedir (Grateau 2004).

AAA periyodik ateşle seyreden tüm kalıtsal hastalıklar içerisinde en sık rastlanan hastalıktır. Karın ağrısı AAA'da en sık görülen semptom olup, hastalığın ilk bulgularından biri olduğu bildirilmektedir (Ugan ve ark. 2011, Odabaş ve ark. 1999). AAA hastalığında MEFV geninin tanımlanması ile moleküler yöntemlerin tanıda kullanılmasına başlanılmıştır (Ugan 2011). MEFV geninde günümüze kadar çok sayıda mutasyonun ve polimorfizimin olduğu bildirilmiştir. Hastalığın en yaygın mutasyonlarının M694V, M680I, M694I, E148Q ve V726A mutasyonları olduğu ve bu mutasyonların en çok ekzon 10 ve ekzon 2 üzerinde yer aldığı bildirilmiştir. AAA hastalarında yapılan çalışmalarda Türk, Yahudi, Arap ve Ermeni popülasyonlarında bu 5 mutasyonun frekansının %80'in

üzerinde olduğu bildirilmiştir (Gershoni-Baruch ve ark. 2001). AAA hatalarında MEFV geninin tanımlanması ve farklı mutasyonlarının tespit edilmesinin hastaların ve ailelerinin tedavilerinde temel tıbbi ve genetik yaklaşımların ortaya konması açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Ugan ve ark. 2011).

Türkiye, AAA hastalığının sık görüldüğü nadir ülkelerden biridir. Ülkemizde AAA hastalığının genetiği konusunda yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda AAA hastalarının farklı bir MEFV genetik profiline sahip olduğu görülmesine rağmen, ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan Hatay ilinde AAA hastalarında MEFV mutasyonlarının sıklığı ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Hatay bölgesinde DNA dizi analizi yöntemiyle ilk kez gerçekleştirilen bu çalışmada ise en sık tespit edilen mutasyonun R202Q olduğu bunu E148Q mutasyonunun takip ettiği tespit edilirken bu mutasyonları M694V, M694I, V726A ve M680I mutasyonlarının takip ettiği tespit saptanmıştır.

Çalışmamızda en yüksek sıklıkta bulduğumuz R202Q mutasyonu 28 hastada belirlenmiş olup, bu hastalardan 5'i homozigot, 11'i heterozigot, 6'sı birleşik heterozigot ve 6'sı da kompleks genotipe sahipti. R202Q mutasyonu literatürde ilk olarak Bernot ve ark. tarafından tarif edilmiştir. Literatürde R202Q mutasyonu ile ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Gizglis ve ark. (2007) tarafından Yunanistan'da yapılan bir çalışmada 152 AAA hastasında R202Q homozigot ve heterozigot mutasyon oranları sırasıyla %9.2 ve %31.6, 140 sağlıklı kontrol grubunda ise %0.7 ve %33.6 oranında bulunmuştur. Türkiye'den Öztürk ve ark. da (2008) bu çalışmayla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Her iki çalışmada, AAA hastalarındaki R202Q homozigot mutasyon sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte R202Q heterozigot mutasyon sıklığı AAA hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda benzer bulunmuştur. Her iki araştırmacı grubu da buldukları sonuçlara göre R202Q homozigot mutasyonunun hastalıkla ilişkili olduğunu ve bu mutasyonun rutin MEFV gen mutasyonu taramaları arasına alınması gerektiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda R202Q mutasyonu allel sıklığı %21.20 oranında saptanmış olup, biz de mu mutasyonun AAA hastalarının moleküler tanısı için rutin uygulamada bakılması gerektiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda R202Q mutasyonunun heterozigot olarak belirlediğimiz hastalarda da AAA klinik bulguları olduğunu gözlemledik. Bu bulgu da bu hastalarda MEFV geninin çalıştığımız 2. ve 10. ekzonları dışında diğer ekzonlarda başka mutasyonlar taşıyabileceklerine işaret etmektedir.

Çalışmamızda ikinci sıklıkta bulduğumuz E148Q mutasyonu 92 hastanın 184 bağımsız allelinin 30'unda (%16.30) sıklığında tespit edilmiştir. Bu mutasyon hastaların 2'sinde (%3.26) homozigot, 14'ünde (%15.21) heterozigot, 12'sinde (%13.04) birleşik heterozigot ve 2 hastada (%3.26) ise kompleks genotip şeklinde saptanmıştır. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda bu mutasyonun sıklığı oldukça farklılık göstermekte olup birçok çalışmada en sık görülen mutasyonlar arasında bulunmaktadır (Öztürk 2008, Paşa 2008, Solak 2008, Ülgenalp 2009, Akın 2010, Etem 2010). E148Q mutasyonu bulgularımız ülkemizde yapılan diğer çalışmaların bulgularıyla uyum göstermektedir. Bu mutasyon Evliyaoğlu ve ark. (2009) ile Yeşilada ve ark. (2012)'nin çalışmalarında birinci sıklıkta görülmekte olup, frekansları sırasıyla %30.8 ve %10.8 olarak belirlenmiştir. Bulgularımız bu iki çalışmanın bulgularıyla ve genel olarak Türkiye'de yapılmış olan diğer çalışmalarda uyum göstermektedir. Buna karşın Ceylan ve ark. (2011) ile DüNDAR ve ark. (2012) çalışmalarında bu mutasyonu 3. en sık görülen mutasyon olarak belirlemiş olup, allel sıklığını sırasıyla %4.42 ve %5.15 olarak saptamışlardır.

Son yıllara kadar yapılan çalışmalar, M694V mutasyonu sıklığının %8.4 ile %67.2 arasında bulunduğunu ve ülkemizde oldukça yaygın bir şekilde bulunduğunu göstermektedir (Akar 1999, Yalçınkaya 2000, Yılmaz 2001, Güneşaçar 2005, Turkish FMF Study Group 2005, Paşa 2008, Ülgenalp 2009, Akın 2010, Etem 2010). M694V mutasyonu AAA hastalığının yaygın olarak görüldüğü İranlı Azeri Türkler, Yahudiler, Araplar ve Ermenilerde birinci sıklıkta görülen mutasyondur (Cazeneuve 1999, Ben-Chetrit 2000, Medlej-Hashim 2000, Gersoni-Baruch 2001, Ben-Chetrit 2002, Al-Alami 2003, Ayesh 2005, Medlej-Hashim 2005, Majeed 2005, Sarkisian 2005, Mattit 2006, Bonyadi 2009, Dode 2009). Çalışmamızda, yukarıda zikredilen yurt içi ve yurt dışı çalışmalardan farklı olarak, M694V mutasyonu üçüncü sık görülen mutasyon olup allel frekansı %7.95 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda 4. ve 5. sıklıkta bulunan yaygın mutasyonlar M680I ve V726A olup bu iki mutasyonun frekansı sırasıyla %2.4 ve %1.85 olarak belirlenmiştir. Türk FMF çalışma grubu (2005) ile Demirkaya ve ark. (2008) geniş serilerde yaptıkları araştırmalarında M680I ve V726A mutasyonlarını 2. ve 3. en sık görülen mutasyonlar olarak belirlemişler ve bu iki mutasyonun allel frekanslarını, M680I için %14.4 ve %14.10, V726A için ise %8.6 ve %9.70 olarak rapor etmişlerdir (Turkish FMF Study Group 2005, Demirkaya ve ark. 2008). Buna karşın Yeşilada ve ark (2012) ile Evliyaoğlu ve ark. (2010)

AAA hastalarında bu mutasyonları en sık görülen 3., 4. ya da 5. mutasyon olarak saptamışlar ve bu iki mutasyonun allel frekanslarını, M680I için %4.77 ve %6.70, V726A için ise %1.63 ve %8.60 olarak rapor etmişlerdir. Güneşaçar ve ark. (2005) ise M694V, M680I and V726 mutasyonlarının AAA hastalarındaki allel sıklığını sırasıyla %51.66, %17.22 and %10.55% olarak belirlemişlerdir. M680I ve V726 mutasyonları frekansı İran Azeri Türkü AAA hastalarında %15.2 ve %17 olarak saptamışlardır (Bonyadi ve ark., 2009). Bu iki mutasyon Arap ve Ermeni AAA hastalarında ise en sık görülen 3. ve 2. mutasyonlar olarak rapor bildirilmiştir (Cazeneuve ve ark. 1999, Sarkisian ve ark. 2005, Medlej-Hashim ve ark. 2005, mattit ve ark. 2006, Settin ve ark. 2007). Çalışmamızda M694V, M680I and V726A mutasyonlarının frekanslarının yukarıda bahsedilen diğer çalışmaların frekanslarına göre düşük olduğu görülmektedir. Çalışmamız ile Türkiye’de yapılan diğer çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar çalışmaya dahil edilen hasta sayısından, Türk FMF hastalarındaki genetik heterojeniteden ve çalışmalarda kullanılan mutasyon tarama yöntemlerinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda M694I mutasyonu 6 hastada saptanmış olup allel frekansı %4.89 olarak belirlenmiştir. Türk ve İran Azeri Türkü AAA hastalarında oldukça nadir görülen bir mutasyondur bu mutasyonun frekansı %0 ile %2.8 arasında değişmektedir (Yalçınkaya ve ark. 2000, Güneşaçar ve ark. 2005, Ülgenealp ve ark. 2009, Bonyadi ve ark. 2009, Akın ve ark. 2010; Dündar ve ark. 2010, Yeşilada ve ark. 2012, Ceylan ve ark. 2012). M694V yönünden elde ettiğimiz sonuçlar Türkiye’de ve İran’da (Azeri Türklerinde) yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Bu mutasyonun frekansı Cezayir Suudi Arabistan, Fas, Tunus, Filistin ve Ürdün gibi Arap ülkelerinde oldukça yaşayan AAA hastalarında oldukça yüksek olup, frekansı %9.8 ile %80 arasında değişmektedir (Al-Alami ve ark. 2003, Belmahi ve ark. 2006, Öztürk ve ark. 2009, Al-Wahadneh ve ark. 2010).

Çalışmamızda iki hastada heterozigot genotipte A744S ve iki hastada kompleks E230K mutasyonu tespit ettik. E230K mutasyonuna sahip hastalardan birisi heterozigot genotipe, diğeri ise kompleks genotipe (E230K/E148Q/R202Q) sahipti. Çalışmamızda ayrıca bir hastada R761H ve diğeri hastada K695R mutasyonu saptandı. R761H mutasyonuna sahip hasta M694I mutasyonunu da birleşik heterozigot halde taşımaktaydı. Diğeri hasta ise K695R mutasyonunun yanında birleşik heterozigot halde E148Q mutasyonuna sahipti.

Türkiye’de yapılan bazı çalışmalarda A744S ve R761H mutasyonlarının en sık rastlanan nadir mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde Ege Bölgesinde yapılan 3 farklı geniş kapsamlı çalışmada, A744S frekansı %0.7, %1.5 ve %0.36 olarak, R761H frekansı ise %1.08, %1.2 ve %1.07 olarak belirlenmiştir (Ülgenalp ve ark. 2009, Etem 2010, Doğan ve ark. 2012). Çalışmamızda bu iki mutasyonun sıklığı sırasıyla %1.09 ve %0.54 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda hasta sayısı, diğer çalışmalara göre sınırlı olmakla birlikte bu iki mutasyonun frekansı ülkemizdeki diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir. Çalışmamızdan farklı olarak, Demirkaya ve ark. (2008) AAA hastalarında A744S mutasyonu saptamadıkları çalışmalarında, R761H mutasyonu frekansını (%6.7) Türkiye ortalamasına göre yüksek bulmuşlar ve bu mutasyonun Türkiye’de AAA’nın rutin tanısında kullanılması gerektiğini önermişlerdir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar MEFV gen mutasyonlarının ülkemizde oldukça heterojen olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda rastladığımız E230K ve R695R mutasyonları da ülkemizde görülen nadir mutasyonlar arasında sayılmaktadır.

AAA hastalarımızda bulduğumuz MEFV 2. ve 10. ekzon mutasyonların sıklığı ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında arada bazı mutasyonlar açısından benzerlik, diğer bazı mutasyonlar açısından ise farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır. Türkiye’de MEFV gen mutasyonlarının heterojen olması, çalışmalara dahil edilen hastaların sayısı ve de mutasyon tarama yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabilir. Ülkemizde MEFV gen mutasyonları genellikle en yaygın görülen 5 mutasyonun (M694V, M694I, E148Q, M680I ve V726A) RFLP, ARMS veya benzeri bir yöntemle ya da 12 farklı mutasyonun strip (Reverse dot blot hybridisation, RDBH) yöntemiyle taranması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerle sadece sınırlı sayıda ve bilinen mutasyonlar taranabilmektedir. Türkiye’de MEFV gen mutasyonları heterojen olduğundan dolayı RFLP, ARMS, RDBH ve benzeri yöntemler nadir görülen ya da bilinmeyen mutasyonları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda bazı laboratuvarlar MEFV gen mutasyonlarının taranması için DNA dizi analizi yöntemini tercih etmektedirler. DNA dizi analizi yöntemi ile MEFV geninin tamamının taranmasının maliyeti yüksek olacağından dolayı, bu yöntemle sıcak noktalar denen, mutasyonların yoğun olarak bulunduğu ekzonlar taranmaktadır. Bu nedenle rutin laboratuvar uygulamalarında MEFV geni mutasyonlarının belirlenmesinde genellikle mutasyonların daha yoğun olarak bulunduğu 2. ve 10. ekzonlar taranmaktadır. Bu gerekçelerden dolayı

biz de çalışmamızda, MEFV 2. ve 10. ekzon mutasyonlarının taranmasında DNA dizi analizi tekniğini tercih ettik. Bu nedenle gerek ülkemizde, gerekse de AAA hastalığının yaygın olduğu ve MEFV mutasyonları yönünden heterojenite gösteren ülkelerde DNA dizi analizi yönteminin uygulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

MEFV geninin tanımlanması hastalığın klinik bulguları ile özgül genotipler arasındaki ilişkinin araştırılmasına olanak sağlamıştır. M694V homozigotluğu ile amiloidoz arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda veri mevcuttur. Bu mutasyonun amiloid riskinin yüksek olduğu kuzey Afrika Yahudi populasyonunda çok sık rastlanan mutasyon olması dikkatleri çekmiş ve böyle bir birlikteliğin nedeni bu populasyonda muhtemel ikinci bir polimorfizmin varlığına bağlı olabilir diye düşünülmüşse de daha sonra diğer etnik gruplarda yapılan çalışmalar M694V ile amiloidoz arasındaki ilişkiyi desteklemiştir. Çalışmalar diğer MEFV gen mutasyonlarını taşıyan hastalarda da amiloidoz gelişebileceğini göstermektedir. Veriler yeterince güçlü olmamakla birlikte M694V homozigot AAA hastalarında muhtemelen artrit atağı riski de artmış olabilir (Kastner 2001). M694V homozigotlarda hastalık erken yaşlarda başlamakta, daha sık atak ve daha fazla sayıda eklem tutulmakta ve yüksek doz kolşisin tedavisi gerekmektedir (Ben-Chetrit 1998). V726A mutasyonu ve diğer mutasyonlara sahip olan hastalarda da amiloidoz görülebilmektedir. Türk FMF Çalışma Grubu (2005)'nin 2838 vakayı kapsayan çalışmasında M694V homozigot hastalarda hastalığın daha erken yaşlarda başladığı, bu hastalarda artrit ve artralji bulgularının diğer MEFV mutasyonları taşıyan hastalara göre daha fazla olduğu, buna karşın homozigot M694V mutasyonu ile amiloidozis arasında korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmada, hastalarımızda hastalık başlangıç yaşının; 17.1 ± 11.9 , tanı yaşının; 29.2 ± 13.8 olduğu tespit edilirken, hastalık başlangıcı ile tanı yaşları arasında geçen sürenin ise (yıl olarak tanıdaki gecikme) 12.5 ± 11.9 olduğu saptandı. Ayrıca hastalarımızın %90.7'sinde karın ağrısı, %60.2'sinde ateş, %75.7'sinde eklem ağrısı, %66.9'unda kas ağrısı, %56.3'ünde göğüs ağrısı ve %10.7'sinde erizipel benzeri döküntüler mevcut olup MEFV gen mutasyonlarıyla ya da demografik verilerle klinik bulgular arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır.

Çalışmamızda AAA hastalarında MEFV geni mutasyonları yanında, apoptozisin regülatör mekanizmalarından Fas/FasL gen polimorfizlerinin varlığı bölgemizde ilk olarak araştırılmıştır. Bilindiği gibi apoptozis organizmanın çeşitli doku ve hücrelerinde fizyolojik hücre ölümünü düzenleyen ve hemostazisin devamlılığını sağlayan önemli bir biyolojik döngüdür (Hacker ve Vaux, 1997, Zornig ve ark. 2001). TNFRSF6 (Tumor Necrosis Factor Reseptor Super Family 6) CD95 TNFRSF6 veya APO-1 TNFRSF6 olarak ta bilinen Fas molekülü bir hücre yüzey resptörü olup birçok hücre tipinde apoptotik sinyali sağlamaktadır (Muschen ve ark. 2000). Tümör nekroz faktör süper ailesinin üyesi olan ve TNFS6 veya CD95L olarak ta isimlendirilen FasL, kendi reseptörü olan Fas'a bağlanarak apoptozis kaskatını başlatmaktadır. Bu nedenle Fas-FasL, apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir mekanizma olup, Fas-FasL sistemindeki bozukluklar greft rejeksiyonu, otoimmün hastalıklar ve bazı kanser türlerinde aşırı ya da yetersiz apoptoz nedeniyle önemli bir role sahiptir (Lieber ve ark. 1974, Savil 1994, Houston ve O'connel 2004, Zang ve ark. 2009, Zang ve ark. 2009, Wang ve ark. 2012).

Nötrofil inflamasyonunun eşlik ettiği otoinflamatuvar bir hastalık olan ailevi Akdeniz ateşinde (AAA) Fas ve FasL gen polimorfizmleri ile ilgili günümüzde sınırlı sayıda bilgi mevcut olup yeterli değildir. AAA' da Fas ve FasL ekspresyonuyla ilgili ise az sayıda çalışma mevcuttur. Kiraz ve arkadaşlarının (2003) serum sFas düzeyini gösteren çalışmalarında, amiloidozis gelişmemiş inaktif AAA hastalarında serum sFas düzeyi yüksek, amiloidli hastalarda ise düşük bulunmuştur. Araştırmacılar, inaktif hastalardaki sFas düzeyi yüksekliğinin kronik subklinik inflamatuvar aktivite nedeniyle polimorfonükleer lökositlerin apoptozisinin gecikmesine bağlı olabileceğini, amiloidli hastalardaki düşük sFas düzeylerinin ise artmış apoptoza katkıda bulunabileceğini ileri sürmüşlerdir. (Kiraz ve ark. 2003).

Özen ve arkadaşları (2001) ise akım sitometri yöntemi ile nötrofillerin yüzeyinde Fas ve FasL ekspresyonunu AAA hastalarında, kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Ayrıca akut atak dönemindeki AAA hastalarında nötrofil apoptozisinin arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, AAA hastalarında ve kontrol grubunda Fas geninin promotor bölgesindeki -670 A/G ve FasL geninin promotor bölgesindeki -844 T/C polimorfizmleri incelenmiş ve FasL geninde -844 TC alleli sıklığı AAA hastalarında (%52.58) kontrol grubuna (%72.85) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük

bulunmuştur (P=0.01). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte FasL geni -844 CC genotipi sıklığı ise AAA hastalarında (%23.71) kontrol grubuna (%14.30) göre yüksek olarak saptanmıştır.

FasL geninin promoter bölgesindeki -844 T/C fonksiyonel polimorfizminin CAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPβ) olarak isimlendirilen transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinde yer aldığı ve C allelinin, T allelinden daha yüksek bazal transkripsiyon aktivitesine sahip olduğu, CC genotipine sahip olanlarda bu aktivitenin 2-3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark. 2003). FasL ekspresyonundaki artış malignant transformasyon ve progresyona neden olabilir (Houston ve ark., 2004). Birçok çalışmada çeşitli kanser türlerinde FasL geninde -844 T/C polimorfizminin ya da sFasL düzeyinin yüksek olduğu, bunun da apoptozu engellediği bildirilmektedir (Reimer ve ark. 2000, Mottolese ve ark. 2000, Munakata ve ark. 2000, Ito ve ark. 2000, Cao ve ark. 2010).

Çalışmamızda da AAA hastalarında -844 CC genotipi sıklığının kontrol grubuna göre yüksek olması FasL gen ekspresyonunu, dolayısıyla da serum sFas düzeyini artırarak nötrofil apoptozisinin gecikmesine ve neticede nötrofilik inflamasyona neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda kesin bir yargıya varmak için ileri çalışmalara ihtiyaç olup özellikle FasL gen polimorfizmleriyle birlikte FasL düzeylerinin de çalışılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

1. Bu çalışma AAA hastalarında MEFV geni mutasyonları ile Fas-670 A/G ve FasL -844 T/C fonksiyonel gen polimorfizmleri ile AAA hastalarında DNA dizi analizi yöntemiyle MEFV geni mutasyon sıklığı ve dağılımlarının birlikte araştırıldığı ilk ve en kapsamlı çalışmadır.
2. Çalışmamızda, AAA hastalarında ve kontrol grubunda Fas geninin promotor bölgesindeki -670 A/G ve FasL geninin promotor bölgesindeki -844 T/C polimorfizmleri incelenmiş ve FasL geninde -844 TC alleli sıklığı AAA hastalarında (%52.58) kontrol grubuna (%72.85) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (P=0.01). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte FasL geni -844 CC genotipi sıklığı ise AAA hastalarında (%23.71) kontrol grubuna (%14.30) göre yüksek olarak saptanmıştır.
3. Gerek ülkemizde, gerekse de AAA hastalığının yaygın olduğu ve MEFV mutasyonları yönünden heterojenite gösteren ülkelerde DNA dizi analizi yönteminin uygulanması gerektiğini düşünmekteyiz.
4. Çalışmamızda R202Q mutasyonu allel sıklığı %21.20 oranında saptanmış olup, biz de bu mutasyonun AAA hastalarının moleküler tanısı için rutin uygulamada bakılması gerektiğini düşünmekteyiz.
5. Hastalarımızda MEFV gen mutasyonlarıyla ya da demografik verilerle, klinik bulgular arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır.
6. Bölgemizde AAA hastalarında popülasyon içi farklılıklarla açıklanabilecek yüksek oranda genetik heterojenite gözlenmiştir. Hastalarda bölgesel orijin AAA tanısında tespit edici bir faktör olarak değerlendirilebilir.

7.KAYNAKLAR

1. **Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçınkaya F, Akar N, Tümer N.** MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mut*, **2000**, 15:118-119.
2. **Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçınkaya F, Akar E, Çakar N, et al.** MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mutat*, **1999**, 288: 1-5.
3. **Akin H, Onay E, Turker E, Cogulu O, Ozkinay F.** MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever from the Aegean region of Turkey. *Mol. Biol. Rep.* **2010**, 37:93–98.
4. **Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, et al.** Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish Population. *Am J Hum Genet*, **1999**, 64: 949-962.
5. **Al-Alami JR, Tayeh MK, Najib DA, Abu-Rubaiha ZA, Majeed HA, et al.** Familial Mediterranean fever mutation frequencies and carrier rates among a mixed Arabic population. *Saudi Med J*, **2003**, 24:1055-9.
6. **Alp H, Tan H, Orbak Z, Selimoğlu A.** Ailevi Akdeniz ateşi. *Sendrom*, **1998**, 10(9): 64-69.
7. **Al-Wahadneh A, Hababbeh Z, Qussous A, Abedalgani F, Alzabn S.** Genotype Analysis of Children with Familial Mediterranean Fever at King Hussein Medical Center. *JRMS*, **2010**, 17(2): 80-83.
8. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **1998**, 281:1305-1308.
9. **Ayesh SK, Nassar SM, Al-Sharef WA, Abu-Libdeh BY, Darwish HM.** Genetic screening of familial Mediterranean fever mutations in the Palestinian population. *Saudi Med J*, **2005**, 26:732-737.
10. **Barakat MH, El-Khawad AO, Gumaa KA** Metaraminol Provocative test: a specific diagnostic test for familial mediterranean fever. *Lancet*, **1984**, 1: 656-657.
11. **Bar- Eli M, Ehrenfeld Mi, Levy M.** Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Am J Med Sci*, **1981**, 281: 15-18.
12. **Belmahi L, Sefiani A, Fouveau C, Feingold J, Delpech M, et al.** Prevalence and distribution of MEFV mutations among Arabs from the Maghreb patients suffering from familial Mediterranean fever. *C R Biol*, **2006**: 329(2):71-74.
13. **Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM.** A 52 KD protein is a novel component of the SSA/Ro antigenic particle, *J Exp Med*, **1988**, 167: 1560- 1571.
14. **Ben-Chetrit E, Touitou I.** Familial Mediterranean Fever in the world, *American College of Rheumatology*, **2009**, 61(10):1447-1453.
15. **Ben-Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D.** The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a disease causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat*, **2000**, 15:285–286.
16. **Ben-Chetrit E, Urieli-Shoval S, Calko S, Abeliovich D, Matzner Y.** Molecular diagnosis of FMF: lessons from a study of 446 unrelated individuals. *Clin Exp Rheumatol*, **2002**: 20:25-29.
17. **Ben-Chetrit E, Levy M.** Familial Mediterranean fever. *Lancet*, **1998**, 351: 659-664.

18. **Bernot A, Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, et al.** Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet*, **1998**, 7:1317-1325.
19. **Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni-Baruch R.** Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics*, **1999**, 103:70.
20. **Bodar EJ, Drenth JP, Van Der Meer JW, Simon A.** Dysregulation of innate immunity: hereditary periodic fever syndromes, *Br J Haematol*, **2008**, 144(3):279-302.
21. **Bonyadi M, Esmacili M, Jalali H, Somi MH, Ghaffari A, et al.** MEFV mutations in Iranian Azeri Turkish patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* **2009**, 76: 477-480.
22. **Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN.** Pylrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *Q J Med*, **1998**, 91: 603-606.
23. **Booty MG, Chae JJ, Masters SL.** Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum*, **2009**, 60: 1851-1861.
24. **Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Lin DX, et al.** Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*. **2010**, 49:(11):944-50.
25. **Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, et al.** MEFV gene analysis in Armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavourable renal prognosis of the M694V homozygous genotype genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet*, **1999**, 65: 88-97.
26. **Chae JJ, Geryl W, Katharina R, Howard J, Nona TC, et al.** The familial mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kB through its N-terminal fragment. *Blod*, **2008**, 112(5):1794-1803.
27. **Chae JJ, Wood G, Masters SL.** The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2006**, 103:9982-9987.
28. **Çalışkan M,** Apoptosis: Programlanmış hücre ölümleri, *Türk J Zool*, **2000**, ek sayı:31-35.
29. **Çobankara V, Balkarlı A.** Ailesel Akdeniz Ateşi, *Pam Med J*, **2011**, 4(2):86-98.
30. **Daniels M, Shohat T, Brenner-Ullman A, Shohat M.** Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am J Med Genet*, **2005**, 55:311-4.
31. **Deborah LG, Nitza G, Shoham and Daniel L, Kastner JJC.** The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kB through its N-terminal fragment, bloodjournal. *Hematologylibrary.org* , **2008**, 112: 1794-1803.
32. **Demirkaya E, Tunca Y, Gok F, Ozen S, Gul D.** A very frequent mutation and remarkable association of R761H with M694V mutations in Turkish FMF patients. *Clin Rheumatol* **2008**, 27:729-732.
33. **Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chetrit E, Cattán D, et al.** Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet*, **1998**, 6: 95-97.
34. **Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattán D, Dervichian M, et al.** Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* **2000**, 92:241-6.

35. **Dogan HO, Koca Y, Erden G, Karaaslan Y, Bozat H.** Evaluating MEFV mutation frequency in Turkish familial Mediterranean fever suspected patients and gender correlation: a retrospective study. *Mol Biol Rep* **2012**, 39:6193–6196.
36. **Doğanavşargil E, Keser G.** Ailesel Akdeniz Ateşi. Klinik Romatoloji, *Ege Romatoloji*, **1999**, 467-474.
37. **Erken E.** Ailesel Akdeniz Ateşi. Klinik Romatoloji, Ankara, *Hekimler Yayın Birliği*, **1996**, 263-268
38. **Erken E, Ozer HT, Gunesacar R.** Plasma interleukin-10 and interleukin-12 levels in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int.* **2006**, 26(9):862-4.
39. **Etem E.** Familial Mediterranean Fever: A Retrospective Clinical and Molecular Study in the East of Anatolia Region of Turkey. *The Open Rheumatology Journal*, **2010**, 4: 1-6.
40. **Evlıyaoglu O, Bilici S, Yolbas İ, Kelekçi S, Şen V.** Diyarbakır yöresi Ailevi Akdeniz Atesli çocuklarda MEFV gen mutasyon sıklıkları. *Dicle Tıp Dergisi*, **2009**, 36(2):80-84.
41. **Fairbrother WJ, Gordon NC, Humke EW, O'Rourke KM, Starovasnik MA, et al.** The pyrin domain: a member of the death domain-fold superfamily. *Protein Sci*, **2001**, 10(9): 1911-1918.
42. **Gershoni –Baruch R, Shinawi M, Leah K.** Familial Mediterranean Fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet*, **2001**, 9: 634-637.
43. **Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, et al.** MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial mediterranean fever. *Clin Genet* **2007**, 71: 458–467.
44. **Gilhar A, Yaniv R, Assay B, Serafimovich S, Ullmann Y, et al.** Fas Pulls the Tigger on Psoriasis. *American Journal of Pathology*, **2006**, 168:170-175; DOI: 10.2353/aipath.2006.041354.
45. **Goldfinger SE.** Colchicine for familial Mediterranean fever [letter]. *N Engl J Med*, **1972**, 287:1302.
46. **Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, et al.** Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clinical exp rheumatology*, **2002**, 20(26):45-53
47. **Gunesacar R, Erken E, Kasap H, Ozer HT.** Comparison of Amplification Refractory Mutation System and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Techniques Used for the Investigation of MEFV Gene Exon 10 Point Mutations in Familial Mediterranean Fever Patients Living in Cukurova Region(Turkey). *Genetic Testing*, **2005**, 9: 220-225.
48. **Grell M, Krammer PH, Scheurich P.** Segregation of APO-/Fas antigen-and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *European Journal of Immunology*, **1994**, 24(10).
49. **Grateau G.** Clinical and genetic aspects of hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology*, **2004**, 43:410-415.
50. **Hacker G, Vaux DL.** A chronology of cell death. *Apoptosis*, **1997**, 2:247-56.
51. **Houston A, O'Connell J.** The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, **2004**, 4:321- 6.
52. **Ito Y, Monden M, Takeda T, Eguchi H, Umeshita K, et al.** The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, **2000**, 82: 1211–1217.
53. **Jack JCW, Mather IH.** Cloning and molecular analysis of cDNA encoding Bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J Biol Chem*, **1990**, 265: 14481-14486.

54. **Janeway T, Mosenthal H.** An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting with a study of the nitrogen metabolism. *Trans Ass Am Phys*, **1908**, 23: 504-518.
55. **Kaçar S, Karatan O, Tutkak H.** Amiloidozisde serum IL-6, IL-1 α , TNF α düzeyleri, *Ankara Üniv.Tıp Fak.Mecmuası*, **1999**, 52(4):219-225.
56. **Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, et al.** A functional polymorphism in Fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*, **2002**, 29:1183-1188.
57. **Kastner DL.** Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. Koopman WJ. A Textbook of Rheumatology. *Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins*, **2001**, 1400-1441.
58. **Kutlay S, Yilmaz E, Koytak ES, et al.** A case of familial Mediterranean fever with amyloidosis at the first manifestation. *Am J Kidney Dis*, **2001**, 38:34.
59. **Kiraz S, Ertenli I, Ozturk MA, Haznedaroğlu IC, Calgüneri M, et al.** Increased soluble FAS suggest delayed apoptosis in Familial Mediterranean Fever complicated with amyloidosis. *J Rheumatol*, **2003**, 30(2):313-5.
60. **Kılınç M.** Kahramanmaraş'ta ailevi akdeniz ateşi hastalarında mefv mutasyonlarının araştırılması. *Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Kahramanmaraş*, **2008**.
61. **Kogan A, Shinar Y, Lidar M, Revivo A, Langevit P, et al.** Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype II states and absence of a perceptible biological advantage for carrier state. *Am J Med Genet*, **2001**, 102:272-6.
62. **Kıyıkım AA, Altun B, Arıcı M.** Ailevi Akdeniz Ateşinin Değişen Yüzü: Patofizyolojide ve Tanıda Genetik Özellikler. *Türkiye Tıp Dergisi*, **2000**, 7:(4): 201-204.
63. **Kiraz S, Ertenli I, Ozturk MA, Haznedaroğlu IC, Calgüneri M, et al.** Increased soluble FAS suggest delayed apoptosis in Familial Mediterranean Fever complicated with amyloidosis. *J Rheumatol*, **2003**, 30(2):313-5.
64. **Lightfoot RW, Mc Carty DJ, Koopman WJ.** Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. Arthritis and Allied Conditions. *Philadelphia: Lea & Fabiger*, **1993**, 2: 1121-1137.
65. **Lidar M, Livneh A.** Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *Neth J Med*, **2007**, 65: 318-324.
66. **Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro GA.** continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, **1976**, 17: 62-70.
67. **Lightfoot RW.** Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. Mc Carty DJ, Koopman WJ, Arthritis and Allied Conditions. *Philadelphia: Lea & Fabiger*, **1993**, 2: 1121-1137.
68. **Livneh A, Langevitz P, Zemer D.** Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, **1997**, 40(10):1879-1885.
69. **Majeed HA, El-Khateeb M, El-Shanti H, Abu Rabaiha Z, Tayeh M, et al.** The spectrum of familial Mediterranean fever gene mutations in Arabs: report of a large series. *Semin Arthritis Rheum* **2005**, 34:813-818.
70. **Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brot TM, Frucht DM, et al.** The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalises with actin filaments. *Blood*, **2001**, 98:851-859.
71. **Matzner Y, Ayesh S, Hochner- Celniker D,** Proposed mechanism of inflammatory attacks in familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med*, **1990**, 150: 1289-1291.

72. **Mattit H, Joma M, Al-Cheikh S, El-Khateeb M, Medlej-Hashim M, et al.** Familial Mediterranean fever in the Syrian population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation. *Eur J Med Genet* **2006**, 49:481-486.
73. **McDermot MF.** Genetic clues to understanding periodic fevers, and possible therapies. *Trends Mol Med*, **2002**, 8(12):550-554
74. **Medlej-Hashim M, Serre JL, Corbani S, Saab O, Jalkh N, et al.** Familial Mediterranean fever (FMF) in Lebanon and Jordan: a population genetics study and report of three novel mutations. *Eur J. Med Genet*, **2005**, 48:412-420.
75. **Medlej-Hashim M, Rawashdeh M, Chouery E, Mansour I, Delague V, et al.** Genetic screening of fourteen mutations in Jordanian familial Mediterranean fever patients. *Hum Mutat*, **2000**, 15:384.
76. **Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, et al.** Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics*, **2000**, 105:70.
77. **Mottolese M, Buglioni S, Bracalenti C, Cardarelli MA, Ciabocco L, et al.** Prognostic relevance of altered Fas (CD95)-system in human breast cancer. *Int J Cancer*, **2000**, 89: 127-132.
78. **Munakata S, Enomoto T, Tsujimoto M, Otsuki Y, Miwa H, et al.** Expressions of Fas ligand and other apoptosis-related genes and their prognostic significance in epithelial ovarian neoplasms. *Br J Cancer*, **2000**, 82: 1446-1452.
79. **Muschen M, Warskulat U, Beckmann MW.** Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med*, **2000**, 78:312-325.
80. **Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, Seguret F, Demaille J, et al.** Reduced MEFV Messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, **2002**, 46(10):2785-2793.
81. **Odabaş AR, Çetinkaya R, Kaya H.** Familial Mediterranean Fever. *AÜTD*, **1999**, 31:147-151.
82. **Ozen S, Uckan D, Baskin E, Besbas N, Okur H, et al.** Increased neutrophil apoptosis during attacks of familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol*, **2001**, 19:68-71.
83. **Oskay T, Erdem C.** Apoptoz ve dermatolojideki önemi. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji*, **2000**, 10:213-221
84. **Öktem S, Mustafa H, Özhan ÖD.** Apoptozisin önemi. *Toraks*, **2001**, 2(1):91-95.
85. **Örün E, Yalçınkaya F.** Türk tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve Amiloidoz, *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, **2003**, 12(1):1-7.
86. **Özturk A.** Is MEFV Gene Arg202Gln (605 G>A) A Disease-Causing Mutation? *Turk. J. Med. Sci.* **2008**, 38 (3): 205-208.
87. **Özturk A, Elbosky E, Elsayed SM, Alhodhod M, Akar N.** Mutational Analysis of the MEFV Gene in Egyptian Patients with Familial Mediterranean Fever. *Turk J Med Sci* **2009**, 39(2): 229-234.
88. **Papin S, Dugesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey-Moisan M, et al.** Alternative splicing at the MEFV locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus, *Hum Mol Genet*, **2000**, 9(20):3001-3009.
89. **Pasa S, Altintas A, Devcioglu B, Cil T, Danis R, et al.** Familial Mediterranean Fever gene mutations in the southeastern region of Turkey and their phenotypical features. *Amyloid* **2008**, 15: 49-53.

90. **Patarca R, Freeman GJ, Schwartz J, Singh RP, Kong QT, et al.** Rpt-1, an intracellular protein from helper/ inducer T cells that regulates genes expression of interleukin-2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, 85: 2737-2738.
91. **Peynircioğlu B, Yılmaz E.** Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının moleküler temeli, *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2006**, 37:223-229.
92. **Pras E, Aksentjevich I, Gruberg I, Balow Je Jr, Prosen I, et al.** Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med*, **1992**, 326: 1509-1513.
93. **Pras E, Shinar Y, Shoham N, Livneh A, Padeh S, et al.** Genotype-phenotype correlations in Israeli FMF patients. *Familial Mediterranean Fever II. International Conference*, 3-7 May, **2000**, Antalya, Turkey, pp: 29-31.
94. **Reimer T, Herrnring C, Koczan D, Richter D, Gerber B, et al.** FasL:Fas ratio – a prognostic factor in breast carcinomas. *Cancer Res*, **2000**, 60: 822–828.
95. **Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, et al.** Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **2001**, 19: 39320-39329.
96. **Rigante D, Ansuini V, Bertoni B, Pugliese AL, Avallone L, et al.** Treatment with anakinra in the hyperimmunoglobulinemia D/periodic fever syndrome. *Rheumatology International*, **2006**, 27,:97–100.
97. **Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Schwabe AD, et al.** Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet*, **1989**, 34: 168-172.
98. **Sarkisian T, Ajrapetyan H, Shahsuvaryan G.** Molecular study of FMF patients in Armenia. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2005**, 4:113-116.
99. **Saviæ M, Dubljanin B, Kostiaè M, Vasiljeviæ I, Niksiaè M.** Accumulation of selenium from selenized yeast in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Proc. Int. Conf. ICMBMP7 Mushroom Biol. Mushroom Prod*, **2011**, 1:135- 139.
100. **Savic S, Laura JD, Michele B, Michael FM.** Familial mediterranean fever and related periodic fever syndroms\autoinflammatory disease, *Curr Opin Rheumatol*, **2012**, 24(1):103-112.
101. **Savill JS.** Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest*, **1994**, 24: 715–723.
102. **Settin A, El Baz R, Abd Rasool M, El Khalegy H, El Sayed O, et al.** Clinical and molecular diagnosis of Familial Mediterranean Fever in Egyptian children *Gastrointestinal Liver Dis.* **2007**: 16(2): 141-5.
103. **Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K. et al.** ASC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* **2002**, 293: 1314-1318.
104. **Shohat M and Halpern GJ.** Familial mediterranean fever – A review, *Genetics in Medicine*, **2011**,13(6).
105. **Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, et al.** Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet*, **1999**, 7: 287-292.
106. **Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, et al.** Functional FAS promoter polymorphism are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, **2003**, 63:4327-4330.

107. **Solak M, Yildiz H, Koken R, Erdogan M, Eser B, et al.** Analysis of Familial Mediterranean Fever gene mutations in 202 patients with familial mediterranean fever. *Genet Test* **2008**, 12: 341-4.
108. **Stanjov S, Kastner DL.** Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Current Opinion in Rheumatology*, **2005**, 17:586-599.
109. **Stoffman N, Magal N, Shohat T, Lotan R, Koman S, et al.** Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups. *Eur J Hum Genet*, **2000**, 8:307-10.
110. **Swissa M, Schul V, Korish S, Livneh A, Pras M, et al.** Dtermination of autoantibodies in patients with familial Mediterranean fever and their first relatives. *J Rhematol*, **1991**, 18: 606-608.
111. **The French FMF consortium.** Candidate gene for familial mediterranean fever. *Natur Genet*, **1997**, 17: 25-31
112. **The International FMF Consortium.** Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene familia re likely the cause familial mediterranean fever. *Cell*, **1997**, 90: 797-807.
113. **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.
114. **Tutar E, Akar N, Atalay S, Yilmaz E, Akar E, et al.** Familial Mediterranean fever gene (MEFV) mutations in patients with rheumatic heart disease. *Heart*, **2002**, 87:568-569.
115. **Touitou I.** The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet*, **2001**, 9:473-483.
116. **Topaloglu R, Ozaltin F, Yilmaz E, Ozen S, Balci B, et al.** E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, **2005**, 64(5):750-752.
117. **Touitou I.** The spectrum of mutations. II International conference of familial Mediterranean fever. Antalya, Turkey, **2000**, 3:26.
118. **Uren AG, Pakusch CJ, Hawkins KL, Puis DL.** Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1996**, 93:4974-4978.
119. **Ugan Y, Ermiş F, Şahin M.** Ailesel Akdeniz Ateşi. *Tıp Fak.Derg.*, **2011**, 18(4):139-143.
120. **Ülgenalp A.** DEGETAM'a yönlendirilen hastalardaki MEFV geni mutasyonlarının dağılımı, *DEÜ Tıp Fak. Derg*, **2009**, 23(6):53-58
121. **Yu JW, Wu J, Zhang Z, et al.** Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ*, **2006**, 13:236- 249.
122. **Yeşilada E, Savacı S, Yüksel Ş, Gülbay G, Otlu G, et al.** Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *İnönü Üniv.Tıp Fak. Dergisi*, **2005**, 12(4):235-238
123. **Yesilada E, Taskapan H, Gulbay G.** Prevalence of known mutations and a novel missense mutation (M694K) in the MEFV gene in a population from the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Gene*, **2012**, 511:371-374.
124. **Yalcinkaya F, Cakar N, Misirlioglu N, Tumer N, Akar N, et al.** Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology*, **2000**, 39:67-72.
125. **Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al.** Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet*, **2001**, 9:553-5.

126. **Yalçınkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, Tümer N, Akar N, et al.** Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation independent amyloidosis. *Rheumatology*, **2000**, 39: 67-72.
127. **Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer Di Sohar E, Pras M.** Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*, **1995**, 57: 455-57.
128. **Zornig M, Hueber A, BaumW, Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **2001**, 1551:1-37.
129. **Zadeh N, GetzuG T, Grody WW.** Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: Integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genetics IN Medicine*, **2011**, 13:(3).
130. **Zhang Z, Qiu L, Wang M, Tong N, Li J, et al.** The FAS ligand promoter polymorphism, rs763110 (-844C>T), contributes to cancer susceptibility: evidence from 19 case-control studies. *Eur J Hum Genet*, **2009**, 17: 1294-1303.
131. **Zhang Z, Xue H, Gong W, Wang M, Yuan L, et al.** FAS promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 34 case-control studies. *Carcinogenesis*, **2009**, 30: 487-493.
132. **Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, et al.** A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol*, **2003**, 170:132-138.
133. **Wang W, Zheng Z, Yu W, Lin H, Cui B, et al.** Polymorphisms of the FAS and FASL genes and risk of breast cancer. *Oncology Letters*, **2012**, 3: 625-628.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul' da doğdu. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi' nde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu.