

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FMF)
HASTALARINDA MUTASYON NOKTALARININ
ARMS, RFLP VE STRİP YÖNTEMİYLE
TARANMASI

DOKTORA TEZİ

Serbülent YİĞİT

Samsun
Ocak-2006

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FMF)
HASTALARINDA MUTASYON NOKTALARININ
ARMS, RFLP VE STRİP YÖNTEMİYLE
TARANMASI

DOKTORA TEZİ

Serbülent YİĞİT

Danışman: Prof. Dr. Hasan BAĞCI

Samsun
Ocak-2006

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan BAĞCI (OMÜ)

Üye: Prof. Dr. Kuddusi CENGİZ (OMÜ)

Üye: Prof. Dr. Gülşen ÖKTEN (OMÜ)

Üye: Prof. Dr. Engin YILMAZ (HÜ)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Nurten KARA (OMÜ)

Bu tez Enstitümüz Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Süleyman ÇELİK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Genetik alanındaki Doktora eğitimim ve tez çalışmam sırasında bana her türlü desteği veren değerli danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya öncelikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında destek veren tez izleme komitesi ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kuddusi CENGİZ'e, hem tez çalışmalarım da hem de laboratuvar çalışmalarım da desteğini esirgemeyen tez izleme komitesi ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nurten KARA'ya, eğitimim sırasında özellikle Sitogenetik alanında destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülşen ÖKTEN'e, laboratuvar çalışmalarım da her türlü yardım ve katkısından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e, eğitimim sırasında destek olan Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN'a, tez çalışmalarım sırasında destek olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tekin AKPOLAT'a, İstatistik çalışmalarımın değerlendirilmesinde destek olan Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR'a ve laboratuvarında sınırsız malzeme desteğiyle pratik yapmama olanak veren Prof. Dr. Crag MELLO'ya teşekkür ederim.

Moleküler Genetik Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Sağlık Teknisyenleri Öznur MIRİK'a, Mukadder AYDOĞDU ve Ömür UZUN'a teşekkür ederim. Sitogenetik Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm Sağlık Teknisyenleri Mustafa DÜZ'e, Hanife AK'a, Murat FİDAN'a, Burcu ÜRESİN ve Emine KAHRAMANOĞLU'na teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlileri Özlem SEZER'e, Şengül TURAL'a, Nevin KARAKUŞ ve Emre TAŞKIN'a, personel Namık CANTÜRK ve Erkan CINDIK'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya mali destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu'na (T-322) ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkür ederim.

Son olarak Doktora eğitimim sırasında verdikleri manevi destek ve sabırdan dolayı öncelikle annem ve babama, ağabeyim Erbay ve kardeşimERCÜMENT'e, arkadaşlarım Av. Seyit Ahmet ERGÜN ve Araş. Gör. İ. Agah İNCE'ye teşekkür ederim.

ÖZET

BÖLGEMİZDEKİ AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FMF) HASTALARINDA MUTASYON NOKTALARININ ARMS, RFLP VE STRİP YÖNTEMİYLE TARANMASI

Serbülent YİĞİT, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ocak 2006

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), kısa aralıklarla tekrarlayan ateş, peritonit, plevrit ve artrit ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. En ağır komplikasyonu ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan böbrek amiloidozudur. AAA yaygın olarak Non-Askenazi Yahudileri, Ermeni, Türk ve Arap'larda görülür.

AAA'dan sorumlu gen MEFV olarak adlandırılır, pyrin/marenostin proteinini kodlar ve kromozom 16'da (16p 13.3) lokalizedir. AAA hastalığının ağırlığı MEFV geni mutasyon spektrumuyla ilişkilidir. Günümüze kadar MEFV geninde çoğunluğu yanlış anlamlı olan 75 farklı mutasyon saptanmıştır. MEFV geni bulunana kadar AAA tanısı yalnızca klinik semptomlara bakılarak yapılmaktaydı. AAA, Türk popülasyonunda sıklığı 1/1000 civarında olan yaygın bir genetik hastalıktır. MEFV mutasyonlarından her hangi birini taşıma sıklığı ise 1/5'e kadar çıkabilmektedir.

Biz 625 AAA hastası, 165 akraba ve 100 kontrolden oluşan üç grup çalıştık. Değerlendirilen bireylerin büyük çoğunluğu Samsun ve çevresindeki yerleşim birimlerinde yaşamaktadır.

Mutasyon analizi üç farklı metotla (ARMS, PCR/RFLP ve FMF StripAssay) yapıldı. Bu tekniklerin kendi aralarında kıyaslanması sonucu, genetik tanı aracı olarak en pratik ve etkilisinin FMF StripAssay olduğu gözlemlendi. Genotip sonuçları ile Tel-Hashomer Kriterlerini de kapsayan verileri içeren fenotipler ile genotipler arası ilişki SPSS paket program (versiyon12.0) yardımıyla değerlendirildi.

Sonuçlarımız Tel-Hashomer Kriterlerine göre kesin tanılı grubun % 70,6'sında, olası tanılı grubun % 21,5'inde en az iki MEFV mutasyonu bulunduğunu göstermektedir.

Hastalarda Tel-Hashomer Kriterleri dışında gözlemlediğimiz verilerden atak sıklığı, ilk semptom yaşı ve apandisit operasyonu geçirme açısından en az iki mutasyonlu grup ile bir mutasyonlu grup arasında istatistiksel açıdan önemli farklar bulundu. Olasılık, atak sıklığı ve ilk semptom yaşı için $p < 0,01$; apandisit operasyonu geçirme için $p < 0,05$ olarak bulundu.

AAA hastalarında ölçümlenen amiloidoz (% 5,4) ve M694V (% 33,76) sıklıkları literatürde daha önce rapor edilen sıklıklardan daha düşük olarak bulundu. Benzer şekilde erkek: kadın oranı da (0,80) daha önce bildirilenlerden düşük bulundu.

Hasta grubumuzda baktığımız MEFV mutasyonları sıklığı bağımsız allellerde % 60,96, akraba grubumuzda % 42 ve kontrol grubumuzda % 13,5 olarak bulundu. En sık gözlenen mutasyon M694V'dir (% 33,76). Kontrol grubunda taşıyıcı frekansı 1/3,7 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak Samsun ve civar yerleşim birimlerini kapsayan bu çalışmada taşıyıcı frekansı Türkiye'nin diğer bölgelerinde rapor edilenlerden daha yüksek bulundu. Diğer taraftan M694V mutasyonu ve amiloidoz ülkemizin diğer bölgelerine göre daha düşük bulundu. Bunlara ilave olarak, cinsiyetler açısından değerlendirildiğinde, kadın hasta oranı daha yüksek çıktı.

ABSTRACT

SCREENING OF MUTATIONS WITH ARMS, RFLP AND STRIP METHODS IN FAMILIAL MEDITERRANEAN PATIENTS IN OUR AREA

Serbüilent YİĞİT, PhD Dissertation

Ondokuz Mayıs University SAMSUN, January 2006

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive and inherited disease clinically characterized by recurrent short, self-limited attacks of fever accompanied by peritonitis, pleurisy, and arthritis. The most severe complication is amyloidosis and renal failure, which may develop in later years. It is prevalent mainly in non Ashkenazi Jews, Armenians, Turks, and Arabs.

The FMF gene, called MEFV, is located on the short arm of chromosome 16 (16p13.3) and encodes a protein named pyrin/marenostrin. Sequence alterations of the marenostrin protein are responsible for the FMF disease. The disease severity is related to the spectrum of MEFV mutations. Up to now 75 different mutations have been detected on the MEFV gene. Most of these mutations are missense mutations. The diagnosis of familial Mediterranean fever (FMF) has until recently been based on clinical symptoms alone. Discovery of the *MEFV* gene has enabled a molecular approach to diagnosis, which is already well established. FMF disease is a common genetic disorder, and affects around 0,1 % of the population of Turkey. One person in every five carry the defective gene (The carrier state for FMF in populations in which the disease is most commonly seen may be as high as 1 out of 5).

The study was carried out with three groups. The first group consisted of 625 FMF patients The second group comprised 165 relatives of the patients. The third group included 100 healthy controls. Great majority of the subjects were residing in the Samsun province and its environs.

Mutation analysis was done by three different methods: ARMS, PCR plus RFLP and FMF StripAssay. Comparison of the methods indicated that the FMF StripAssay was the most effective and practical method of the three. The SPSS software (version 12) package was used to test the correlations between the genotypes obtained by molecular analysis and the phenotypes of the patients who met the Tel-Hashomer criteria for diagnosis.

Our analysis showed that 70,6 % of the patients meeting the Tel-Hashomer criteria carried at least two mutations in the MEFV gene, while 21,5 % of the patients classified as probable FMF patients had two mutations.

Besides the Tel-Hashomer criteria, there were statistically significant differences between those with at least two mutations and those with only one mutation with regard to the frequency of the attacks, the first symptom age, and having appendectomy. The significance levels were $p < 0.01$ for frequency of attacks and first symptom age and $p < 0.05$ for appendectomy.

In FMF patients, amyloidosis (5.4 %) and M694V (33,76 %) frequencies were lower than those previously reported in the literature. Similarly, male:female ratio was 0.80, again lower than those reported before.

The frequencies of the independent alleles in the patients, relatives and the control groups were % 60,96 %, 42 % and 13,5% , respectively. The most frequently observed mutation was M694V (33,76 %). In the control group, the carriers frequency was 10/37

In conclusion this data suggests that the carrier frequency is the highest in Samsun and its environs than the so far reported frequencies from the other regions of Turkey. On the other hand, the frequencies of the M694V mutation and amyloidosis are significantly lower in Samsun region than those reported previously from other regions of Turkey. Also, the FMF disease sex ratio (female:male ratio) in Samsun population is higher than those reported earlier for other regions.

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Tanım.....	2
2.2. AAA Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi.....	2
2.3. AAA Genetiği.....	4
2.4. AAA Patogenezi.....	17
2.5. Ailevi Akdeniz Ateşinde Genotip-Fenotip İlişkisi.....	20
2.6. Ailevi Akdeniz Ateşinde Klinik Tanı.....	22
2.6.1. Ateş.....	22
2.6.2. Abdominal Ataklar.....	22
2.6.3. Plevral Ataklar.....	23
2.6.4. Perikardial Ataklar.....	23
2.6.5. Artiküler Atakları.....	23
2.6.6. Kas Ağrıları.....	24
2.6.7. Deri Lezyonları.....	24
2.6.8. Akut Skrotum.....	24
2.6.9. İnfertilite.....	24
2.6.10. İzole Fibril Ataklar.....	25
2.6.11. Vaskülit.....	25
2.6.12. Amiloidoz.....	26
2.7. Laboratuvar Testleri.....	26
2.8. Ailevi Akdeniz Ateşi Tedavi ve Tanı kriterleri.....	27
III. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması.....	31
3.2. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler.....	31
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonların Hazırlanması.....	32
3.4. Elektroforez Solüsyonları.....	33
3.5. DNA İzolasyonu.....	33

3.5.1. DNA İzolasyon Solüsyonları.....	33
3.5.2. DNA İzolasyon Yöntemi.....	34
3.5.3. FMF StripAssay Yöntemi İçin DNA İzolasyonu Yöntemi.....	36
3.6. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	37
3.7. Kullanılan Moleküler Tanı Teknikleri.....	38
3.7.1 ARMS (Ampification Refractory Mutation System) Yöntemi.....	38
3.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	40
3.7.3. PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorphism) Yöntemi	40
3.7.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi.....	42
3.7.5. FMF StripAssay Yöntemi Uygulanışı.....	43
IV. BULGULAR.....	46
V. TARTIŞMA.....	61
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
VII. KAYNAKLAR.....	70
VIII. EKLER.....	79
IX. ÖZGEÇMİŞ.....	81

I. GİRİŞ

Familial Akdeniz Ateşi (AAA), İngilizce kısaltmasıyla FMF (Familial Mediterranean Fever) özellikle Türkler, Ashkenazi Yahudileri, Ermeniler ve Araplarda sık görülen, kısa süreli tekrarlayan ateşli ataklar, peritonit, plevrit ve artrit ile karakterize, ileri aşamalarda amiloidoz ve böbrek yetmezliğinin geliştiği otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Lightfoot ve ark. 1993; Erken e ark. 1996). AAA hastalık geninin lokusu (Mediterranean FeVer; MEFV) 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolu üzerinde (16p13.3 noktasında) bulunduğu saptanmış ve bu gen 1997 yılında Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu tarafından birbirlerinden bağımsız olarak klonlanmıştır (Pras ve ark. 1992; Fransız FMF Konsorsiyumu 1997; Uluslararası FMF Konsorsiyumu 1997).

MEFV geni 781 amino asitten oluşan ve pyrin/marenostrin adı verilen bir proteini kodlamaktadır (Kastner ve ark., 2001). Günümüzde bu proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte inflamasyon olayının kontrolünde rol oynadığı ve özellikle nötrofillerde ifade olduğu ileri sürülmektedir (Fransız FMF Konsorsiyumu 1997; Uluslararası FMF Konsorsiyumu, 1997).

Bu çalışmada Samsun ili ve civarındaki AAA hastaları, onların I. derece yakınları ve sağlıklı kontrol grubunda; “Amplification Refractory Mutation System” (ARMS) ve “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP) yöntemleri ile major nokta mutasyonlarından M694V, M680I(G/C) ve V726A mutasyonlarının ve de “FMF Strip Assay” kit yöntemi ile M694V, M680I(G/C), V726A, E148Q, P369S, F479L, M680I(G/A), I692del, M694I, K695R, A744S, R761H mutasyonlarının belirlenmesini, yöntemlerin birbirleriyle kıyaslanmasını, mutasyon frekanslarının saptanmasını ve genotip-fenotip ilişkisinin yorumlanmasını amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Familial Akdeniz Ateşi (AAA) Tanım

AAA Doğu Akdeniz havzasındaki etnik gruplarda özellikle Türk, Yahudi, Ermeni ve Arap popülasyonunda sık gözlenen, bununla birlikte Yunan, İtalyan, İspanyol ve Japon gibi diğer popülasyonlarda da gözlenmiş otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Alp ve ark., 1998; Goldfinger 1972; Kastner ve ark., 1991).

AAA klinik olarak dönem dönem tekrarlayan 38-40 dereceye varan ateş, peritonit, plevrit ve özellikle diz bilek ve dirsekleri tutan akut sinovit ile 1-3 gün devam eden ve semptomsuz dönemler içeren bir hastalıktır. Ataklar arası dönemde hastaların genel durumları oldukça normaldir. Bununla birlikte çocuklarda baş ağrısı ve yorgunluk şikayetleri gözlenmiştir. Ataklar her hafta tekrarlayabileceği gibi bazen haftalarca hatta aylarca tekrarlamayabilir. Klinik semptomlar genellikle hastaların yaklaşık % 25' inde yaşamın ilk 4 yılında, % 80'inde ise ilk 10 yılında ortaya çıkar. Hastalığın en ağır komplikasyonu AA tipi amiloidozdur ve genelde bu gruba giren hastalar daha asemptomatiktir.

2.2.AAA Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Elimizdeki bilgiler ışığında AAA'dan ilk olarak Janeway ve Mosenthal tarafından 1908 yılında bir vakada bahsedilmiştir. Ardından Siegel tarafından 1945 yılında birden fazla olgu klinik tartışmaya açılmış ve hastalık "Benign Paroksizmal Peritonit" olarak tanımlanmıştır. Birkaç yıl sonra 1950'lerin ilk yıllarında Fransız araştırmacılar hastalıkla ilgili ilk nefropatileri bildirmiş ve ardından da Sohar ve Heller'in tanımlamaları hastalığın pek çok klinik detayını ortaya koymuştur (Alp H. ve ark., 1998). Profilaktik tedavi amacıyla kolşisini ilk kullanan ise Goldfinger'dir ve hala tedavide en yaygın kullanılan ilaçtır (Fransız FMF Konsorsiyumu, 1996).

AAA hastalığı geçmişten günümüze değin çok farklı şekilde isimlendirilmiştir. Bunlar; benign paroksizmal peritonit, periyodik ateş, periyodik peritonit, familial paroksizmal poliserozit, La maladie periodique, Ermeni hastalığı, gibi çok çeşitli isimler

kullanılmıştır. Günümüzde ise *Familial Mediterranean Fever* yani Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) yaygın olarak kullanılmaktadır (Alp ve ark., 1998).

AAA hastalığı üzerine yapılan çalışmalar başlangıçta klinik özelliklerin saptanması, karakterizasyonu ve tanımlanması üzerine olmuştur. Ardından AAA tedavisinde kolşisinin kullanılmaya başlanması ve etki mekanizması çalışmaları 1970' li yıllarda başlamıştır (Goldfinger, 1972). Klinik özelliklerin belirlenmesi ve tedavide kolşisinin kullanılmaya başlanmasından sonra araştırmalar hastalığın genetiğinin ortaya konması yönünde devam etmiştir. Bu amaçla öncelikle hastalıktan sorumlu proteini kodlayan genin saptanması amaçlanmıştır (Shohat ve ark., 1990). Bağlantı analizi çalışmalarıyla hastalıktan sorumlu genin hangi kromozom üzerinde lokalize olduğu araştırılmış ve 1992 yılına gelindiğinde Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde AAA geninin gen lokusunun 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3 noktasında olduğu bulunmuştur (Pras ve ark., 1992). Ardından İsrail, Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya'dan katılan çalışma grupları Uluslararası AAA Konsorsiyumu'nu kurmuşlardır. Aynı dönemde İsraili araştırmacılar ve birkaç Fransız laboratuvarı birlikte çalışarak ikinci bir konsorsiyum olan Fransız AAA Konsorsiyumu'nu kurmuşlardır. Her iki konsorsiyum birbirinden bağımsız olarak çalışmalarını sürdürmüştür. 1997 yılına gelindiğinde ise eş zamanlı olarak her iki konsorsiyum da AAA genini saptamışlardır. AAA hastalığının geni hastalığın Akdeniz bölgesindeki popülasyonlarda görülmesi ve en öne çıkan semptomun ateş olmasına itafen Akdeniz ateşi anlamına gelen MEFV (Mediterranean FeVer / MIM 249100) olarak adlandırılmıştır.

AAA hastalığı özellikle doğu Akdenize kıyısı olan ülkelerde Türk, Yahudi, Ermeni ve Arap popülasyonunda sık görülür. Bu etnik gruplar içinde de kuzey Afrikalı Sefardik (Endülüs-İspanya) Yahudilerinde sık gözlenirken Aşkenazi Yahudilerinde nadirdir. Günümüzde Yunanistan, İtalya gibi güney doğu Avrupa ülkelerinde, Almanya, Polonya, Avustralya gibi orta Avrupa ülkelerinde hatta Uzakdoğu ülkelerinden Japonya da AAA hastaları bildirilmiştir (Goldfinger 1972; Kastner ve ark., 1991; Doğanavşargil ve ark., 1999; Ben-Chetrit ve ark., 1998; La Regina ve ark., 2004; Kotone-Miyahara, 2004).

Türkiye'de ülke genelinde yaygın olmakla birlikte, ilk veriler AAA hastalarının çoğunun Orta Anadolu kökenli olduğunu düşündürse de son çalışmalar Doğu ve Kuzey

Anadolu kökenli hasta yoğunluğunun daha fazla olduğunu göstermiştir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005).

Türkiye’de hastalık prevalansı yaklaşık olarak 1:1000 iken bu rakam İsrailde 1:500 kadar çıkabilmektedir. (Ozen ve ark., 1998; Dinc ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001; Tunca ve ark., 2002; Turkish FMF Study Group, 2005). Taşıyıcılık frekansı ise populasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Türklerde 1:5, Kuzey Afrika Yahudilerinde 1:6-8, Irak Yahudilerinde ise 1:13.3 ve İsrail’de 1:11 ve Ermenilerde taşıyıcılık frekansı 1:7, Araplarda 1:4.3 olarak saptanmıştır (Rogers DB. ve ark., 1989; Ben-Chetrit E. ve ark., 1998; Daniels M. ve ark., 1995; Yılmaz E. ve ark., 2001; Gersoni-Baruch R. ve ark 2001). Özellikle bu etnik gruplarda yaygın olarak rastlanması AAA hastalığının MEFV mutasyonlarındaki dağılıma bakarak yaklaşık 2000-2500 yıl önce Orta Doğu’da ortaya çıkıp Anadolu, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Ermenistan’ı içine alan Ön Asya bölgelerine yayıldığının göstergesi olarak kabul edilmiştir (Ben-Chetrit ve ark., 1998).

2.3. AAA Genetiği

AAA’nın otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Shohat ve ark.’ı ikiz kardeşler üzerinde yaptıkları çalışmalarda tek yumurta ikizleri ile çift yumurta ikizlerini hem klinik açıdan hem de kalıtım kalıbı açısından değerlendirmişlerdir. Tek yumurta ikizlerinde hastalık klinik açıdan uyum göstermiş ancak semptomların ağırlığı açısından farklar görülmüştür, çift yumurta ikizlerinde ise genetik açıdan uyum ikizlerin sadece dörtte birinde gözlenmiştir (Shohat ve ark.,1992; Rogers ve ark., 1989).

AAA yatay geçişlidir ve kuşak atlar yani otozomal resesif kalıtım kalıbına uymaktadır. Ancak bazı populasyonlarda taşıyıcı frekansının yüksek ve akraba evliliklerinin sık olduğu durumlarda dikey kalıtım benzeri geçiş gözlenebilir. Pseudodominant kalıtıma benzeyen bu sonuç kalıtım kalıplarıyla ilgili çalışmalarda bazı araştırmacıların hastalığın otozomal dominant geçişli olduğunu ileri sürmelerine yol açmıştır (Yuval ve ark., 1995). Kalıtıma ek bir bilgi vermesi açısından örnek verebileceğimiz ve Aşkenazi Yahudilerinde yapılan örnek çalışmada E148Q mutant allelinin hastalığın penetransını artırdığı ve bu allelin çocuklara geçişinin daha çok

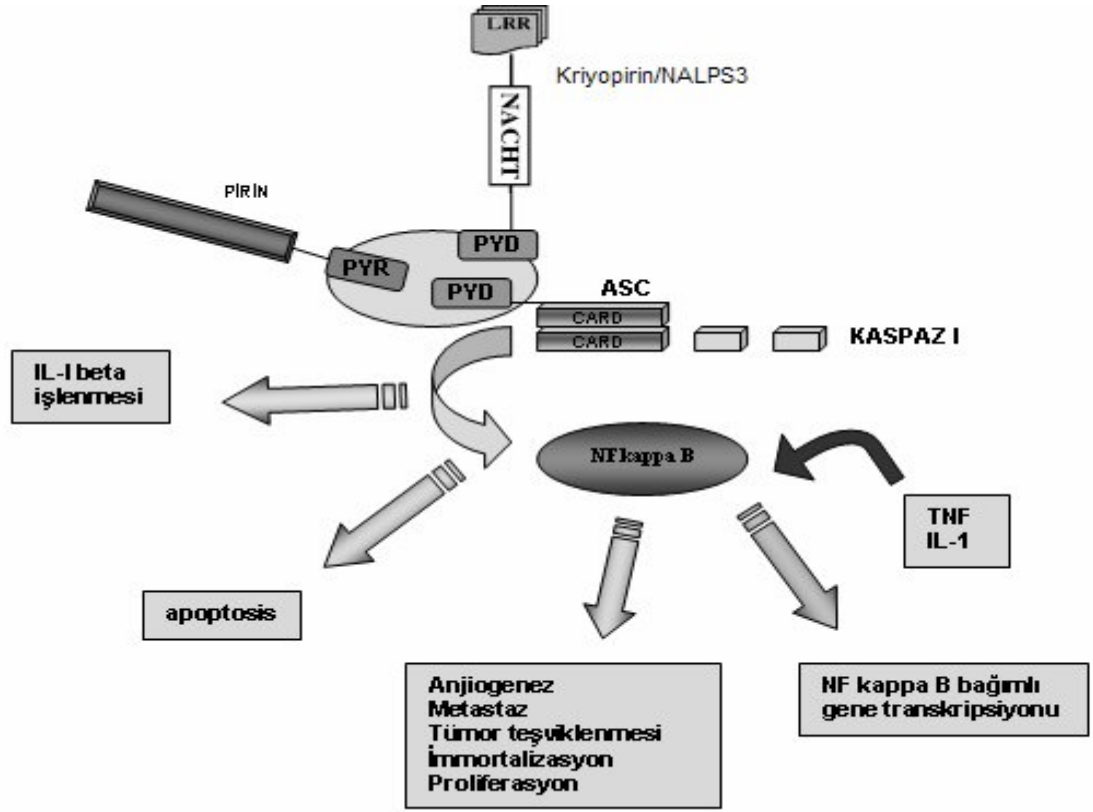
olduğu saptanmış ve böylece otozomal dominant kalıtıma benzer yanıtıcı sonuçlar görüldüğü bildirilmiştir (Aksentijevich ve ark 1999)

1992 yılında 16. kromozomun kısa kolu üzerinde (16p13.3) lokalize olduğu pozisyonel klonlama tekniği ile saptanan MEFV geninin iki ayrı konsorsiyum tarafından eş zamanlı olarak 1997 yılında moleküler dizisi bulunmuştur. MEFV geni bulunduktan sonra moleküler çalışmalar kısa sürede hız kazanmıştır (Fransız FMF Konsorsiyumu., 1997; Uluslararası FMF Konsorsiyumu.,1997; Pras ve ark., 1992; Fransız FMF Konsorsiyumu., 1996; Levy ve ark., 1996). Genomda 15 kb'lık bir bölge içeren ve 10 ekzondan oluşan MEFV geni 3700 baz çiftlik (b) bir mRNA kodlamaktadır. Protein çalışmalarında daha çok nötrofil ve monositlerde ifade olduğu kanıtlanmıştır. Protein iki ayrı konsorsiyum tarafından farklı isimlerle adlandırılmıştır. Bunlardan Uluslararası AAA Konsorsiyumu proteine Yunanca bir kelime olan ve 'ateş' anlamına gelen 'Pyrin', Fransız AAA Konsorsiyumu ise Latince bir kelime olan ve 'bizim deniz' anlamına gelen 'Marenostrin' adını vermiştir. Günümüzde her iki isimlendirme de halen kullanılmaktadır. MEFV genindeki 10 ekzon ve 9 intronun toplamı 14600 baz çiftidir ve intron-ekzon ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmektedir (www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche1.php).

Tablo 1. MEFV geni genel yapısı

Gen Adı:	MEFV (Mediterranean FeVer)	
Protein	Pyrin/Marenostrin	
Transkript pozisyonu:	chr16:3292313-3306912 (16p13.3)	Uzunluk 14.600 bç
Kodlanan DNA dizi analizi pozisyonu:	hr16:3293426-3306872	Uzunluk 13.447 bç
Ekzon/İntron numarası:	Pozisyon	Uzunluk (bç)
Ekzon #1	3306914 – 3306596	317
Intron #1	3306597 – 3305076	1522
Ekzon #2	3305077 – 3304443	633
Intron #2	3304444 – 3300066	4379
Ekzon #3	3300067 – 3299716	350
Intron #3	3299717 – 3299290	428
Ekzon #4	3299291 – 3299194	96
Intron #4	3299195 – 3297532	1664
Ekzon #5	3297533 – 3297301	231
Intron #5	3297302 – 3296833	470
Ekzon #6	3296834 – 3296810	23
Intron #6	3296811 – 3294874	1938
Ekzon #7	3294875 – 3294758	116
Intron #7	3294759 – 3294572	188
Ekzon #8	3294573 – 3294539	33
Intron #8	3294540 – 3294178	363
Ekzon #9	3294179 – 3294148	30
Intron #9	3294149 – 3293983	167
Ekzon #10	3293984 – 3292313	1670
	Ekzonlar toplamı (mRNA)	3499

Pyrin/Marenostrin 86.4 kDa ağırlığında olup 781 amino asit içeren bir proteindir. Pyrinin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte yangısal olayların cevabının kontrolünde ve hafifletilmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (Jack ve ark., 1990; Rozenbaum ve ark., 1992). Son zamanlardaki çalışma sonuçlarına bakılırsa pyrin/marenostrin proteininin amino terminal ucuyla (1-300. amino asitler) hücre sinyal iletim yolunda görevli bir grup proteinin benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Pyrin/Marenostrin PyD (pyrin bölge) ailesinin bir üyesidir ve NF-kappa'nın da içerisinde olduğu B-hücre sinyal iletiminde rol oynar. NF-kappa ise önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve proinflamatuvar fonksiyonları yönlendirir (Richards ve ark., 2001). PyD bölgesi 95 amino asitten oluşur ve ölüm bölgeleri (DD: death domain), ölüm etkili bölgeleri (DED: death effector domain) ve kaspaz bölgelerini (CARD: caspase recruitment domain) kapsayan ölüm bölgesi üst ailesinin bir üyesidir (Şekil 1). Bu ailenin üyeleri inflamasyon proteinlerinde, apoptozisde rol alan bazı proteinlerde ve protein-protein etkileşiminde rol almaktadır (Fairbrother ve ark 2001). Bu domain ailesinin üyesi proteinler, kaspaz çalıştırıcı proteinlerle birlikte hareket ederek proapoptotik bir protein olan ASC (apoptosis speck complex) oluşumuna katılırlar. ASC de nötrofillerde apoptozisin down regülasyonunda görev alır ve ASC'nin ekspresyonunun inflamasyon olayında arttığı gösterilmiştir (Richards ve ark., 2001).



Şekil 1. PyD bölgesi bulunan proteinler apoptotik speck proteini (ASC) ile etkileşerek inflamasyonu düzenlerler. Pyrin inhibitör olarak rol alırken, ASC ve cryopyrin'in birleşmesi kaspaz-1 yoluyla IL-1'i uyarır. Potansiyel mutasyonlar sonucu pyrindeki fonksiyon kaybı, pyrinin inhibitör rolünü azaltarak otoinflamasyona yol açabilir. Alternatif olarak, MWS/FCU/NOMID hastalarında olduğu gibi, cyropyrine yeni fonksiyon kazandıran mutasyonlar bu yolağı aktif hale getirebilir. ASC, apopitozda ve inflamasyon yanıtının hem baskılanmasında hem de regülasyonunda rolü olan NF-kappa transkripsiyon faktörünün aktivasyonunda etkilidir [(IL-1,interlökin-1; LRR, lösince zengin tekrarlar, (leucine-rich repeats); TNF, tümör nekroz faktörü)] (Padeh S, 2005).

MEFV dokuya özel ekspresyon gösterir. İn vitro çalışmalar ışığında özellikle inflamasyonun düzenlenmesi işlevinde rol aldığı gözlenmiştir (Papin ve ark., 2000). Bununla birlikte proteinin bu mekanizmadaki rolü henüz tam olarak netlik kazanmamıştır. Pyrin/Marenostrin proteinine yönelik yapısal analiz çalışmaları nükleer etkili bir molekül gibi davrandığını desteklemektedir (Papin ve ark., 2000). Yapı analizleri göstermiştir ki protein, iki nükleer lokalizasyon sinyali (419-422 ve 420-437. amino asitler arası), bir bZIP bölge (266-280. amino asitler arası), bir B-box zinc finger motifi (375-407. amino asitler arası) ve bir B30.2 bölge (577-757. amino asitler

arası) içermektedir. Bu bölgeler sırasıyla MEFV genindeki 2,3,4,8 ve 10. ekzonlar tarafından kodlanmaktadır (Goldfinger ve ark., 1972; Shohat ve ark., 1990; Kastner ve ark., 1991; Papin ve ark., 2000). Yapılan bir in-vitro ekspresyon çalışmasında MEFV geni GFP (green fluorescent protein) ile füzyon yapılmış ve stoplazmada da ekspresyonunun varlığı gözlenmiştir (Rogers ve ark., 1989; Papin ve ark., 2000).

Pyrin/Marenostrin halen geçerliliğini koruyan hipoteze göre ya proinflamator mediatörlerden (interlökin-8 ve adezyon molekülleri gibi) ya da transkripsiyonel anti inflamatuvar mediatörler olarak (C5a inhibitörü ve lipokortin-1 gibi) inflamasyon olayında granülosit down regülasyonunda görev yapmaktadır (Rogers ve ark., 1989; The Fransız FMF Consortium., 1996). Pyrin/Marenostrin DNA'ya bağlanma aktivitesi bulunan bazı protein gruplarıyla da benzerlik göstermektedir. Bunlar: rpt-1 (regülatör protein T lenfosit 1) interlökin-2 reseptörü regülasyonunda görevli bir protein, interferon uyarıcı proteinler ve Xnf7 (Xenopus nükleer faktör 7) gibi mitotik faktörlerdir (Ben-Chetrit ve ark., 1998; Jack ve ark., 1990; Patarca ve ark 1988).

MEFV geninde şu ana kadar yapılan çalışmalarda çoğunluğu *missens* (yanlış anlamlı) mutasyon olan 75'in üzerinde mutasyon saptanmıştır. Bunların büyük çoğunluğu en büyük ekzon olan 10. ekzonda toplanmıştır (pyrin'in karboksi terminal kısmı). Şimdiye kadar kayıt altına alınan MEFV geni mutasyonları Tablo 2'de gösterilmektedir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>).

Tablo 2. Günümüze kadar saptanan MEFV mutasyonları

Tablo 2. Günümüze kadar saptanan MEFV mutasyonları

<u>Genel adı</u>	<u>Gen içindeki yeri</u>	<u>Değişiklik</u>	<u>Dizi varyantı</u>	<u>Kullanılan teknik</u>	<u>Değişiklik/ tanımlayıcı RFLP</u>	<u>Protein varyantı</u>	<u>Etkisi</u>	<u>Fonksiyonel test</u>	<u>N Kontroler</u>	<u>Hastalıkla ilgili semptom</u>	<u>İlgili fenotip</u>	<u>Köken</u>	<u>Kaynak</u>	<u>Girilme tarihi Yıl-ay-gün</u>
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#"} }	Ekzon 1	YD	c.124C>T	Sek	?	p.Arg42Trp	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&symptom=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian"} Bilinmiyor	Torosyan, L., Şahsi Yazışma	2001-12-11
A89T	Ekzon 1	YD	c.265G>A	DGGE Sek	?	p.Ala89Thr	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&symptom=YES"} { HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=YES"} }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian"} Bilinmiyor	Cazeneuve, C; Papin, S; et al., { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=14985395" t "sister"} }	2004-09-01	

S108R	Ekzon 2	YD	c.322A>C	Sek RFLP	Acil ccgc	p.Ser108Arg	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} Lübnanlı	Medlej-Hashim,M; Saab,O; Salem N; Chouery,E; Delague,V; Mégarbané,A., Şahsi Yazışma	2002-02-12
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#"} }	Ekzon 2	YD { HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&Qualityalteration=substitution" }	c.329T>C	Sek RFLP	Aval c/ycgrg	p.Leu110Pro	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İspanyol	Domingo C, et al., { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10854105&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11

334_335insG	Ekzon 2	Ins	c.334_335insG	Sek	?	p.Glu112fsX130	ÇK	YOK	100	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO"} }	Bilinmiyor	Diğerleri Güney Kıbrıslı	Booth,DR;Booth,SE;Rowczenio,R;Lachmann,HJ;Hajiroussos,VJ;Hawkins,PN Kongre Özeti: FMF2002,La Grande Motte, France, 2002	2002-10-15
c.390_391insGAGGGAC	Ekzon 2	Ins	c.390_391insGAGGGAC	Sek	?	p.Asn130_Gly131insGluGlyAsn	del/ins	YOK	300	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	25 yıllık tekrarlayan ateş ve eklem tutulumu hikayesini takiben baş ağrısı ve daire	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İtalyan	Pomponi MG, Marino GME, Pietrobono R., Terracciano A., Tabolacci E., La Regina M., Nucera G., Manna R., Gasbarrini G., Neri G. Kongre Özeti: Avrupa İnsan Genetiği Derneği, Munich June 12-15 2004	2004-02-05
S141I	Ekzon 2	YD	c.422G>T	Sek	Foklgatg	p.p.Ser141Ile	?	YOK	1050	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO"} }	Türk Bilinmiyor	Lohse,P; Fuchs,A; Tzaribachev,N Şahsi Yazışma	2005-04-19

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 2	YD	c.442G>C	DGGERFLP Sek	Aval c/ycgrg	p.Glu148Gln	?	YOK	310 0	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish" } Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \\ "t"sister" }	2001-12-11	
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 2	YD	c.443A>T	DGGERFLP Sek	Aval c/ycgrg	p.Glu148Val	?	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&fcttest=N" }	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	Türk Bilinmiyor	Tunca et al Kongre Özeti: II International Familial Mediterranean Conference, Antalya, Turkey, May 2000	2001-12-11

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.488A>C	Sek	?	p.Glu163Ala	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İspanyol	Aldea,A; Arostegui,JI; Campistol,JM; Yagüe,J Şahsi Yazışma	2002-06-18
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.501G>C	Sek RFLP	EcoO109 l rg/gnccy	p.Glu167Asp	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian" } Bilinmiyor	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11

P175H	Ekzon 2	YD	c.524C>A	Sek	?	p.Pro175His	?	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&fctt=U" }	200	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İspanyol	Arostegui JI, Garcia-Consuegra J, Franco W, Yague J Şahsi Yazışma	2004-11-10
T177I	Ekzon 2	YD	c.530C>T	RFLP Sek	Mbol/gat c	p.Thr177Ile	?	YOK	230	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} Lübnanlı	Salem, N; Corbani, S; Chouery, E; Jalkh, N; Medlej-Hashim, M; Megarbane, A Şahsi Yazışma	2005-12-02

S179I	Ekzon 2	YD	c.536G>T	Sek	?	p.Ser179Ile	?	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&fcttest=U" } ?	50	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=YES" }	Türk Bilinmiyor	Timmann,C; et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=14636645" t "sister" }	2004-09-01
P180R	Ekzon 2	YD	c.539 C>G	Sek	?	p.Pro180Arg	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Tekrarlayan ateş, deri tutulumu ve eklem ağrısı	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İspanyol	Arostegui JI, Martinez M, Garcia-Consuegra J, Yague J Şahsi Yazışma	2005-08-16

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.605G>A	RFLP Sek	Avall g/gwcc	p.Arg202Gln	YOK	YOK	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish" } Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	Enternasyonel FMF Konsorsiyumu { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9288758&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.688G>A	Sek	?	p.Glu230Lys	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian" } Bilinmiyor	Torozyan Y, et al Kongre Özeti: 50th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, USA, October 2000	2001-12-11
E251K	Ekzon 2	YD	c.751G>A	Sek	Mboll gaaga	p.Glu251Lys	?	YOK	324	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } Alman	Lohse,P Şahsi Yazışma	2002-12-20

c.761_764dup	Ekzon 2	Dup	c.761_764dupCCGC	Sek	Acil ccgc	p.Asn256ArgfsX325	PT	YOK	1100	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	Türk Bilinmiyor	Lohse,P; Hörwick,E Şahsi Yazışma	2005-08-29
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.800C>T	Sek	Avall g/gwcc	p.Thr267Ile	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish" } Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
A268V	Ekzon 2	YD	c.803C>T	Sek	?	p.Ala268Val	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İspanyol	Aldea A, Arostegui JI, Lao JI, Yague J Şahsi Yazışma	2004-08-19

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 2	YD	c.848C>G	Sek	AccIII t/ccgga	p.Pro283Arg	?	YOK	644	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Turkish" } Bilinmiyor	Haverkamp, T Şahsi Yazışma	2003-12-09
P283L	Ekzon 2	YD	c.848C>T	Sek	Hpall c/cgg	p.Pro283Leu	?	YOK	60	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=YES" } ateş	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Kuzey Afrikalı	Danner; Dumont,B;Touitou,I Şahsi Yazışma	2005-05-23
A289V	Ekzon 2	YD	c.866C>T	Sek RFLP	Acil ccgc	p.Ala289Val	?	YOK	210	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Lübnanlı	Corbani, S; Salem, N; Jalkh, N; Chouery, E; Mégarbané, A Şahsi Yazışma	2005-06-07

G304R	Ekzon 2	YD	c.910G>A	Sek	Bsrl actgg	p.Gly304Arg	?	YOK	324	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Turkish"} Bilinmiyor	Lohse,P Şahsi Yazışma	2002-12-20
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#"} }	Ekzon 3	YD	c.955G>A	Sek	?	p.Glu319Lys	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İspanyol	Aldea, A; Arostegui, JI; Toribio-Galeote, R; Yagüe, J Şahsi Yazışma	2002-10-21
R329H	Ekzon 3	YD	c.986G>A	Sek	NlalIII catg/	p.Arg329His	?	YOK	324	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} Alman	Lohse, P. Şahsi Yazışma	2002-12-20

R354W	Ekzon 3	YD	c.1060C>T	DGGE Sek	?	p.Arg354Trp	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} Libyalı	Dimitri Tchermitchko, Marie Legendre { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=14578331" \t "sister" }	2003-09-08
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#"} }	Ekzon 3	YD	c.1105C>T	RFLP, Sek	Alul ag/ct	p.Pro369Ser	?	YOK	850	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish"} Aşkenazi	Aksentijevich et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1090880&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
P393P	Ekzon 3	YD	c.1179C>T	Sek	?	p.Pro393Pro	YOK	YOK	??	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=unknown"} }	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#"} }	Ekzon 3	YD	c.1223G>A	RFLP, Sek	HpaII c/cgg	p.Arg408Gln	?	YOK	850	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian"} Bilinmiyor	Cazeneuve C, et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10364520&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
c.1260+18C>G	Intron 3	YD	c.1260+18C>G	DGGE Sek	?	-	?	YOK	??	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İspanyol	Dumont, B; Rittore-Domingo, C; Touitou, I Şahsi Yazışma	2005-08-25
c.1260+10C>T	Intron 3	YD	c.1260+10C>T	DGGE Sek	?	-	?	YOK	200	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} Fransız	B, Dumont; C, Rittore-Domingo; I, Touitou Şahsi Yazışma	2005-08-25

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#"} }	Intron 3	YD	c.1261- 28A>G	Sek	Alul ag/ct	-	?	YOK	260	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	Türk Bilinmiyor	Lohse,P; Schneidenbach,R Şahsi Yazışma	2005-09-01
c.1356+4 4A>G	Intron 4	YD	c.1356+44A >G	Sek	Mnll cctc	-	YOK	YOK	6	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO"} }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO"} }	Türk Bilinmiyor	Lohse,P; Rübsamen,H; Minden,K Şahsi Yazışma	2005-12-19
E474K	Ekzon 5	YD	c.1420G>A	SSCP, Sek, RFLP	Mval cc/wgg	p.Glu474Lys	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} Lübnanlı	Medlej-Hashim, M; Corbani,S; Chouery,E; Salem,N; Delague,V; Mégarbané,A Şahsi Yazışma	2002-02-15

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 5	YD	c.1432C>T	Sek	Mwol gcnnnn/ nngc	p.His478Tyr	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İspanyol	Aldea,A; Arostegui,JI; Campistol,JM; Yagüe,J Kongre Özeti: IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest, Hungary, July 15-21 2001	2002-06-18
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 5	YD	c.1437C>G	DGGE Sek	?	p.Phe479Leu	?	YOK	850	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian" } Bilinmiyor	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
V487M	Ekzon 5	YD	c.1459G>A	Sek	?	p.Val487Met	?	YOK	50	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=mixed" } İtalyan+Fransız	Baffico,M; Baldi,M; Şahsi Yazışma	2002-01-17

R501G	Ekzon 5	YD	c.1501C>G	Sek	Bse118l r/ccggy	p.Arg501Gly	?	YOK	50	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO"} }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} } İtalyan	Baffico,M; Baldi ,M Şahsi Yazışma	2002-01-17
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#"} }	Ekzon 5	YD	c.1518C>T	DGGE Sek	?	p.Ile506Ile	YOK	YOK	??	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO"} }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian"} } Bilinmiyor	Cazeneuve C, et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10364520&dopt=Abstract" \t "sister"} }	2001-12-24
c.1587+33C>G	İntron 5	YD	c.1587+33C>G	DGGE Sek	?	-	?	YOK	??	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=YES"} } FMF	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} } Bilinmiyor	Touitou I Şahsi Yazışma	2004-09-20

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \ \ "#" }	Ekzon 7	YD	c.1675C>T	Sek	Tsp509l /aatt	p.Leu559Phe	?	YOK	100	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=unknown" }	Wildhardt, G Şahsi Yazışma	2003-01-13
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \ \ "#" }	Intron 8	YD	c.1759+8C>T	Sek	Bfal c/tag	-	?	YOK	644	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=other" } vietnamlı	Haverkamp T Şahsi Yazışma	2003-12-11
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \ \ "#" }	Intron 8	YD	c.1760-4G>A	Sek	?	-	YOK	YOK	600	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Suudi	Lohse,P; Rübsamen,H; Fuchs,A Şahsi Yazışma	2005-09-01

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 9	YD	c.1772T>C	Sek	?	p.Ile591Thr	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } Fransız	Cattan, D; Throo, E; Touitou, I { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11464238&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22
c.1793-14A>G	Intron 9	YD	c.1793-14A>G	Sek	Apolr/aatty	-	?	YOK	1230	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } Alman	Lohse,P Şahsi Yazışma	2005-09-01
G632S	Ekzon 10	YD	c.1894G>A	Sek	AspS91g/gncc	p.Gly632Ser	?	YOK	100	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=other" } İranlı- Yahudi	Shinar, Y; Menasherow, S; Livneh A. Şahsi Yazışma	2004-12-22

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.1920C>G	Sek	?	p.Ile640Met	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İspanyol	Aldea, A; Arstegui, JI; Espaol, T; Yage, J Şahsi Yazışma	2003-08-01
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.1937C>T	Sek	?	p.Pro646Leu	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=other" } Hintli	Bybee,A, Lachmann,H, Booth,D, Hawkins,P Şahsi Yazışma	2002-08-22
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.1946T>C	Sek	?	p.Leu649Pro	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=other" } Hintli Gujerati	Bybee,A, Lachmann,H, Booth,D, Hawkins,P Şahsi Yazışma	2002-08-22

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 10	YD	c.1967A>C	Sek DGGE	?	p.Glu656Ala	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } Fransız	Touitou I { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11464238&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 10	YD	c.1981G>A	Sek	?	p.Asp661Asn	?	YOK	644	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Türk Bilinmiyor	Haverkamp T Şahsi Yazışma	2003-12-11
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 10	YD	c.2024G>A	Sek DGGE	?	p.Ser675Asn	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İtalyan	Dodé, C et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10842288&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 10	YD	c.2033G>T	Sek	?	p.Gly678Glu	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İngiliz	Lachmann, H et al Kongre Özeti: II International Familial Mediterranean Conference, Antalya, Turkey, May 2000	2001-12-22
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#" }	Ekzon 10	YD	c.2038A>C	Sek RFLP	NIaIII catg/	p.Met680Leu	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Bilinmiyor	Dodé, C et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10842288&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2040G>C	DGGERFLP Sek	Hinflg/antc	p.Met680Ile	?	YOK	250 0	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian" } Bilinmiyor	Fransız and Enternasyonel FMF Konsorsiyumu { HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/multiref_1.html" \t "sister" }	2001-12-11
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2040G>A	DGGERFLP Sek	Hinflg/antc	p.Met680Ile	?	YOK	600	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İtalyan	Aksentijevich, I et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10090880&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2042C>T	Sek	?	p.Thr681Ile	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Bilinmiyor	Booth, D et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10024914&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22

Y688C	Ekzon 10	YD	c.2063A>G	Sek	?	p.Tyr688Cys	?	YOK	162	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} Karışık	Tchernitchko,D Şahsi Yazışma	2004-02-05
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2064C>G	DGGE Sek	?	p.Tyr688X	PT	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European"} İtalyan	Notarnicola, C; Manna,R et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11139259&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-24
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	Del	c.2074_2076del	DGGE Sek	?	p.Ile692del	ÇiDi	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab"} Kuzey Afrikalı	Touitou I Şahsi Yazışma	2002-01-15

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	Del	c.2076_2078del	DGGE Sek	?	p.Ile692del	ÇIDI	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Kuzey Afrikalı	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-24
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	Del	c.2078_2080del	Sek	?	p.Met694del	ÇIDI	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İngiliz	Booth, D et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10024914&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-22
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2080A>G	ARMS DGGE Sek RFLP	HphI ggtga	p.Met694Val	?	YOK	330 0	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othmut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish" } Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	French and Enternasyonel FMF Konsorsiyumu { HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/multiref_1.html" \t "sister" }	2001-12-11

M694L	Ekzon 10	YD	c.2080A>T	Sek	?	p.Met694Leu	?	YOK	324	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Turkish" } Bilinmiyor	Lohse,P Şahsi Yazışma	2002-12-20
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2082G>A	ARMS DGGE Sek	?	p.Met694Ile	?	YOK	1200	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Kuzey Afrikalı	French FMF consortium { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9288094&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-11
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2084A>G	DGGE Sek	?	p.Lys695Arg	?	YOK	1000	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infervers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish" } Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-24

K695M	Ekzon 10	YD	c.2084A>T	Sek	?	p.Lys695Met	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES"} }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO"} }	Türk Bilinmiyor	Keser, I Kongre Özeti: Avrupalı Human Genetics Conference, Munich, Germany, June 12-15, 2004	2005-04-08
{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \\ "#"} }	Ekzon 10	YD	c.2103G>A	Sek DGGE	?	p.Ala701Ala	YOK	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=NO"} }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO"} }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Jewish"} Aşkenazi Yahudileri dışındakiler	Touitou I Şahsi Yazışma	2001-12-24
S703S	Ekzon 10	YD	c.2109C>T	Sek	?	p.Ser703Ser	?	YOK	??	Bilinmiyor	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=unknown"} }	Aksentijevich, I Şahsi Yazışma	2003-11-19

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2110G>A	Sek	?	p.Val704Ile	?	YOK	300	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&othermut=NO" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İngiliz	Lachmann, H et al Kongre Özeti: II International Familial Mediterranean Conference, Antalya, Turkey, May 2000	2001-12-24
I720M	Ekzon 10	YD	c.2160C>G	Sek RFLP	NIaIII catg/	p.Ile720Met	?	YOK	200	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Ürdünlü	Medlej-Hashim,M; Salem,N; Chouery,E; Rawashdeh,M; Delague,V; Haffar,M; Mansour,I; Naman,R; Lefranc,G; Loiselet,J; Mégarbané,A { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11903360" \t "sister" }	2002-01-29

{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2177T>C	DGGERFLP Sek	Alul ag/ct	p.Val726Ala	?	YOK	330 0	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Armenian" } Bilinmiyor	French and Enternasyonel FMF Konsorsiyumu { HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/multiref_1.html" \t "sister" }	2001-12-11
{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2230G>T	DGGEARMS Sek	?	p.Ala744Ser	?	YOK	500	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=Arab" } Kuzey Afrikalı	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-24
P758S	Ekzon 10	YD	c.2272C>T	Sek	?	p.Pro758Ser	?	YOK	??	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	Bilinmiyor	{ HYPERLINK "http://mf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&ancestry=European" } İtalyan	Aksentijevich I. Şahsi Yazışma	2003-04-10

{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF" \l "#" }	Ekzon 10	YD	c.2282G>A	DGGE RFLP Sek	Eco721 cac/gtg	p.Arg761His	?	YOK	600	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&sympt=YES" }	{ HYPERLINK "http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/search/search.pl?maladie=FMF&oth_mut=NO" }	Türk Bilinmiyor	Bernot et al { HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9668175&dopt=Abstract" \t "sister" }	2001-12-24
---	-------------	----	-----------	---------------------	-------------------	-------------	---	-----	-----	--	---	--------------------	---	------------

Kısaltmalar: YD: Yer değiştirme, Ins: İnsersiyon, Del: Delesyon, Dup: Duplikasyon, K: ereve kayması, PT: Prematür terminasyon
del/ins: ereve içi delesyon/insersiyon

2.4. AAA Patogenez

Araştırmalar inflamasyonun olduğu dokularda nötrofillerdeki ASC ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Stehlik ve Reed, 2004). Proinflamatuvar düzenleyici nötrofillerde ASC ekspresyonunun in-vitro olarak arttığı gösterilmiştir (Stehlik ve Reed, 2004). Bu bulgular ASC'nin nötrofil inflamasyonu ve apoptozisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Normalde nötrofiller inflamasyon bölgesindeki görevlerini tamamladıktan sonra apoptozise uğrarlar ancak nötrofillerin apoptozise girmesini sağlayan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (Shiohara ve ark., 2002). Hipoteze göre pyrin/marenostrin proteininin fonksiyonu inflamasyon mediatörlerinin down regülasyonu ve nötrofil apoptozisi olarak öngörülmektedir. Mutant pyrin/marenostrin proteininin ise bu fonksiyonu yerine getiremeyeceği ya da daha az etkili olabileceği düşünülmektedir (Papin, 2000; McDermot, 2002).

AAA'da periton, plevra, perikard ve sinovyum gibi serozal bölgeler ile skrotum, deri ve vasküler dokular etkilenmektedir. Ataklar sırasında polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik aktivitesi artar ve granülositler serozal dokulara yönelir (Bar-Eli ve ark., 1981). Aşırı fiziksel aktivite, psikolojik stres, menstruasyon ve yağlı diyetler gibi faktörler de atağı tetikleyebilen etkililerdir (Ben-Chetrit ve Levy,1998).

AAA klinik olarak tümör nekrozis faktör reseptörü ile ilişkili periyodik sendrom [tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated periodic syndrome (TRAPS)], hiperimmnglobulinemi D ve periyodik ateş sendromu [hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS)], familial soğuk otoimmün sendromu/familial soğuk ürtiker sendromu [familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS)/familial cold urticaria syndrome (FCUS)], Muckle-Wells sendromu [Muckle-Wells syndrome (MWS)], yeni doğan-geç başlangıçlı multisistem inflamatuvar hastalık/kronik infantil nörolojik deri ve eklem sendromu [neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID)/chronic infantile neurologic cutaneous and articular (CINCA) syndrome], Blau sendromu (Blau syndrome), piyojenik steril artrit, piyoderma gangrenozum ve akne [(pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome, (PAPA)] sendromuna benzemektedir (Delpech and Grateau, 2001; Kastner ve O'Shea, 2001; McDermot, 2002; Padeh, 2005; <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>). Otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematoza benzemekle birlikte steroid ve diğer immünosüpresif ajanlara cevap vermemektedir. Ayrıca, AAA'da otoantikörler gösterilememiştir (Ben-

Chetrit ve Levy, 1990; Fradkin, 1995). Bazı periyodik ateş sendromları Tablo 3'te verilmektedir.

Tablo 3. Periyodik ateş sendromları

<u>Hastalığın adı</u>	<u>Kalıtım kalıbı</u>	<u>Gen bölgesi</u>	<u>Protein</u>	<u>Klinik özellikleri</u>	<u>Amiloidoz</u>	<u>Tedavi</u>
FMF	OR	MEFV (16p13)	Pyrin	Tekrarlayan ateş ve peritonit, artrit, plevrit, perikardit ve erisipale benzeri eritem.	Var	Kolşisin
PFAPA	Sporodik	CD2BP1 PSTPIP (13q24)	PSTPIP	Aftoz stomatit, faranjit ve servikal adenitlerin eşlik ettiği periyodik ateş dönemleri,.	Yok	Glukokortikost eroidler
TRAPS	OR	TNFRSF1A (12p13)	TNF reseptör 1	Tekrarlayan ateş, konjunktivit, karın ağrısı, kaşıntı, kas ağrısı, plevrit ve artrit.	Nadiren	Glukokortikost eroidler, etanercept
HIDS	OR	MVK (12p24)	Mevalonat kinaz	Periodik ateş, lenfadenopati, karın ağrısı, kusma daire, baş ağrısı ve kaşıntı.	Yok	Etkili tedavi (simvastatine, etanercept, thalidomide trials) yok
CINCA/NO MID	OD	CIAS1 (1q44)	NALP3	Deri isiliği, kronik menenjit ve eklem tutulumu üçlüsü. Ateş, deforme artrit hepatosplenomegali.	Var	Glukokortikost eroidler, MTX, etanercept, anakinra
MWS ve FCUS	OD	CIAS1 (1q44)	NALP3	Ateş, titreme, soğuk algınlığı, ürtiker(soğukla uyarılmış), ilerleyen halsizlik, kas ağrısı, çoklu eklem ağrısı, periyodik karın ağrısı.	Var	Anakinra, stanozolol

Kısaltmalar: OR, otozomal resesif; OD, otozomal dominant; CINCA, kronik çocukluk çağı nörolojik deri ve eklem sendromu; FCUS, ailesel soğukla uyarılan ürtiker sendromu; FMF, ailesel akdeniz ateşi; HIDS, hiperimmünglobulinemi D ve periodik ateş sendromu; MTX, metotoksilat; MWS, Muckle-Wells sendromu; NOMID, neonatal başlangıçlı çoklu sistem inflamatuvar hastalık; PFAPA, periyodik ateş, adenopati, faranjit, aft sendromu; TNF, tümör nekroz faktör; TRAPS, tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili sendrom.

Farklı dokularda yapılan çalışmalarda (örneğin kemik iliği hücrelerinde) MEFV mRNA'sı saptanamamıştır (Uluslararası FMF Konsorsiyumu,1997). Bununla birlikte proteinin özellikle nötrofillerde ifade edilmesi bu proteinin muhtemelen inflamasyon mediatörlerinin down regülasyonunda görev aldığı hipotezini güçlendirmektedir (Fransız FMF Konsorsiyumu, 1997; Uluslararası FMF Konsorsiyumu,1997). Ancak önemli bir nokta AAA hastalarında MEFV mRNA transkripsiyonu kontrollere göre daha düşük düzeyde bulunmuştur (Notarnicola ve ark., 2002). Mutasyon nedeniyle proteinin görev yapamaması, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna neden olabilir. Bununla birlikte hedefin niçin serozal dokular olduğu açıklık kazanmamıştır (Ben-Chetrit ve Levy, 1998). Ayrıca yapılan bir çalışmada da Çin hamsterlerinde pyrin/marenostrin mutant formlarının subselüler kompartımanlarda rastlandığı tespit edilmiştir (Papin ve ark., 2000; Tidow ve ark., 2000). Bu çalışmada mutant proteinin ve alternatif splayzing ile oluşan izoformların farklı bölge organizasyonları içerebileceği gösterilmiştir (Papin ve ark., 2000; Diaz ve ark., 2004).

AAA hastalarında MEFV genindeki mutasyonlar pyrin/marenostrin proteininin görev yapamamasında önemli bir nedendir. Bu proteindeki mutasyonların varlığı inflamatuvar cevabın artışı ile kendini göstermektedir. Ancak cevabı henüz netlik kazanamayan önemli sorulardan birincisi “Niçin AAA hastalarında hedef bölge serozal dokulardır?”, ikinci önemli soru ise “Neden hastalığın karakteristik semptomlarını da içeren semptomlar yumağı tekrarlar halinde ortaya çıkmaktadır?” (Mijatovic ve ark., 2002). Bu soruların cevabının ve pyrin/marenostrin fonksiyonunun anlaşılmasıyla, AAA patogenezinin çözülmesi yolunda hem hastalık hakkında çok önemli bilgiler edinilecek hem de genel olarak inflamasyon döngüsünü de açıklayıcı yollar öğrenilmiş olacaktır. Ayrıca bu cevaplar benzer hastalıkların patogenezini anlama yönünde de kayda değer bilgiler sunacaktır.

Bugüne kadar MEFV geninde 75 mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu *missens* (yanlış anlamlı) mutasyonlardır ve Tablo2’de gösterilmektedir (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>). Geçmişte yapılan çalışmalarda öncelikle üç major mutasyon (M680I, M694V ve V726A) klinikle sıkı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark., 1998; Tekin ve ark., 2000; Grateau ve ark., 2000; Ben-Chetrit ve Backenroth, 2001; Mansour ve ark., 2001). Özellikle M694V mutasyonunun homozigotluğu hastalığın ağır seyretmesi (semptomların erken yaşta başlaması, kısa

aralıklarla atakların tekrarlanması, tedavi amacıyla yüksek doz kolşisin kullanma zorunluluğu gibi) ve bu mutasyona sahip bireylerde amiloidoz gelişimi arasında bağ kurulmuştur (Mimouni ve ark., 2000; Yalçinkaya ve ark., 2000; Mansour ve ark., 2001; Sayarlıoğlu ve ark., 2004). Bu mutasyon özellikle Afrikalı Yahudiler, Ermeniler, Türkler ve Araplarda sık görülmektedir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda amiloidoz gelişimi için sadece M694V mutasyonunun değil diğer mutasyonların da etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Günümüzde AAA hastalığının şiddeti ve en ağır komplikasyonu olan amiloidoz gelişiminde MEFV geni mutasyonlarının yanı sıra bazı düzenleyici genlerin ve netlik kazanmayan çevresel faktörlerin varlığı tartışılmaktadır (Padeh, 2005; Balcı ve ark., 2002).

MEFV genindeki mutasyonların varlığında inflamasyon olayının kontrolden çıkmasının verdiği bazı değişimler sonucu (hafif ateş gibi) infeksiyöz ajanlara karşı heterozigot avantajı geliştiği ve bunun da özellikle Akdeniz havzasındaki popülasyonlarda mutant gen frekansını artırdığı yönünde yorumlar vardır (Aksentijevich ve ark., 1999; Lucotte, 2001; Kogan ve ark., 2001; Shinar ve ark., 2003). İlave bir bilgi de diğer inflamatuvar hastalıklarda (örneğin multiple skleroz gibi) özellikle M694V mutasyonu başta olmak üzere MEFV mutasyonları açısından taşıyıcılarda bu hastalıklarla ilgili otoimmün cevap şiddetinde ve duyarlılıkta artış gözlenmektedir (Shinar ve ark., 2003).

2.5. Ailevi Akdeniz Ateşinde Genotip-Fenotip İlişkisi

MEFV geninin klonlanmasından sonra hastalığın klinik bulguları ile genotipler arasında ilişkinin ortaya konmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Moleküler tanı çalışmaları yardımıyla çok sayıda AAA hastasına ait genotip sonuçları elde edilmeye başlanmıştır. Geçmişte yapılan moleküler çalışmalarda MEFV genindeki tüm mutasyonların taranması mümkün olmadığı için, DNA dizi analizi çalışmaları başlayana dek hastalara yüzde yüz duyarlı testler uygulanamamıştır (Uluslararası FMF Konsorsiyumu,1997). Bazı mutasyonlarla (M694V gibi) en ağır komplikasyon olan, amiloidoz gelişimi arasında bağlantı kuran pek çok çalışma yapılmıştır (Ben-Chetrit ve Backenroth, 2001; Yalçinkaya ve ark., 2000; Balcı ve ark., 2002; Mansour ve ark., 2001; Keven ve ark., 2004). Yine amiloidoz gelişimi ile ilgili ilave genetik ve çevresel faktörlerin olabileceği tartışılmıştır (Cazeneuve ve ark., 2000; Bakkaloğlu, 2003).

Bunlardan SAA1, SAA2 ve Apo E üzerine yapılan bir çalışmada SAA1 allelik varyasyonları ile amiloidoz arasında ilişki saptanmıştır (Cazeneuve ve ark., 2000; Medlej-Hashim ve ark., 2004).

Üzerinde çok çalışılan M680I, M694V ve V726A mutasyonları çeşitli çalışmalarda hastaların % 40-65'inde saptanmıştır (Akar ve ark., 2000; Ben-Chetrit ve Backenroth 2001; Majeed, 2005). Major mutasyonlar olarak kabul edilen özellikle E148Q, M680I, M694V, M694I ve V726A mutasyonlarını saptamaya yönelik moleküler testler geliştirilmiştir (Eisenberg ve ark., 1998; Touitou, 2003)

Bu mutasyonların AAA hastalarındaki MEFV allellerindeki yüzdelerini gösteren bazı çalışmalara ait bilgiler Tablo 4'te verilmektedir.

Tablo 4. AAA hastalarında MEFV geni mutasyonları ile ilgili bazı yayınlar

M694V (%)	M694I (%)	M680I (%)	V726A (%)	E148Q (%)	İncelenen örnek sayısı		Kaynaklar
97	-	1	-	*	83	Kuzey Afrika Yahudisi	Shahot ve ark., 1988
49	-	24	11	*	37	Ermeni	
61	2	11	12	*	56	Türk	
41	17	16	14	*	167		Yalçinkaya ve ark., 1999
43,5	2,8	12	11,1	*	230		Akar ve ark., 1999
42,05	1,47	7,94	12,05	4,1	170		Gershoni ve ark., 1999
44,8	*	18,7	24,2	*	90		Cazeneuve ve ark., 1999
20	7	9,5	14	*	42		Medlej-Hashim ve ark., 2000
*	*	*	*	7,8	25		Ben-Chetrit ve ark., 2000
44,5	6	14,5	20,5	5,5	27	Amiloidozlu grup	Yalçinkaya ve ark., 2000
60	7,5	12,5	10	5	20	Amiloidozsuz grup	
*	22,6	32,1	27,4	*	220		Gershoni-Baruch ve ark., 2002
51,55	0,44	9,22	2,88	3,55	450		Yılmaz ve ark., 2001
42,3	1,8	0,07	6,65	5	446		Ben-Chetrit ve ark., 2002
38	*	8	4	4	25	Fenotip II	Balci ve ark., 2002
38	14	10	26	13	407		Majeed ve ark., 2005
33,76	-	15,52	4,96	-	625		Bizim çalışmamız
31,2	0,4	14,2	4,8	4,4	499		

(*Bakılmayan mutasyon)

Genetik analizler, klinik tanı konması için değerli ve destekleyici bilgi vermesi açısından son derece önemlidir. Genetik testlerle de desteklenerek tanısı kesinleşen hastalar yaşamları boyunca kullanacakları uygun dozdaki kolşisinle tedavi edilmektedir (Goldfinger ve ark.,1972).

AAA'da üç farklı fenotip vardır. Bunlardan birincisi çocukluk ve adolesan çağda ortaya çıkan peritonit, plevrit, sinovit ve kısa süreli fibril ataklarla kendini gösteren formudur. İkinci fenotip nefropati oluşumuna yol açan ve amiloidozla ilişkili olan formdur (Livneh ve ark., 1999). Üçüncü fenotipte ise hastalar klasik AAA semptomlarına sahiptir ancak mutasyon saptanmaz (Kogan ve ark., 2001).

2.6. Ailevi Akdeniz Ateşinde Klinik Tanı

AAA, kısa süreli tekrarlayan ateşli ataklar, peritonit, plevrit ve artrit ile karakterize ve ileri aşamalarda amiloidoz ve böbrek yetmezliğinin geliştiği otozomal resesif bir hastalıktır. Hastalarda ateş 38.5 ile 40 dereceye kadar çıkabilmektedir. Ataklar genelde 1-3 gün sürer ve ataklar arasında asemptomatik dönem gözlenir ve bu dönemde hastaların genel durumu sıklıkla normaldir. Çocuklarda bazen yorgunluk ve baş ağrısı görülebilir. Tekrarlayan oral aftlar ve yorgunluk hissi gibi nadir semptomlar atak dışı dönemlerde de oluşabilir. Ataklar arası dönem 1-2 hafta sürebileceği gibi haftalarca hatta aylarca da sürebilir. AAA hastalarında, semptomların başlangıç yaşı farklılıklar göstermekle birlikte yaklaşık %80'inde 10 yaşına kadar ortaya çıkar (Padeh, 2005).

2.6.1.Ateş

Hastalığın en karakteristik bulgularından biridir ve hastaların büyük çoğunluğunda ateş 38,5 ile 40 derecelere dek çıkar. Ataklar arası dönemde kaybolur (<http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>).

2.6.2. Abdominal Ataklar

Hastalarda gözlenen en yaygın semptomlardandır ve yaklaşık %90'ında gözlenir. Yaygın abdominal ağrı olabileceği gibi abdominal bölgeyi tutan kas ağrıları ve akut apandisit benzeri tüm karın bölgesine yayılan epigastrik ağrılar da olabilir. Atak

sirasında konstipasyon ve ardından hastaların %30'a yakınında diyare gözlenir. Bu semptom genelde 2-20 saat içerisinde hafifler ve ortalama 24-48 saat içerisinde kaybolur. Akut apandisit atakları ile sıklıkla karıştırıldığı için pediatrik AAA hastalarının yaklaşık %9'u apandisit şüphesiyle acil servislere başvurmakta ve apendektomi gibi yanlış operasyonların yapılmasına dahi yol açabilmektedir. Opera edilen hastalarda peritonda hiperemi ve nötrofilden zengin eksuda vardır. Bu eksudan fibröz yapışıklıklara ve mekanik ileusa neden olabileceği gibi ovaryumları da içine alan fibröz yapışıklıklara yol açarsa bu durum bayanlarda infertiliteye de neden olabilir (Sohar ve ark., 1967; <http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>).

2.6.2. Plevral Ataklar

Hastaların %15-30'unda plevral atak oluşur. Ataklar akut şekilde gelişir, solunum seslerinde azalma gözlenir. Kalp ve göğüs ağrısı gözlenebilir, kısa sürede semptom kendiliğinden kaybolur (<http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>).

2.6.3. Perikardial Ataklar

Perikardit AAA hastalarında nadir görülen bir semptomdur (<http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>). Çocukların yaklaşık %0,8'inde gözlenirken genelde %0,7 ile 1,4 arasında değişir (Kees ve ark., 1997). Ataklar 1-3 gün içerisinde kendiliğinden kaybolur.

2.6.4. Artiküler Ataklar

Artiküler ataklar AAA' da en yaygın olan ikinci semptomdur. Akut olarak yüksek ateş eşliğinde genelde 24 saat sürer ve çoğu olguda monoartrit şeklindedir. Genellikle diz ve ayak bileği daha az sıklıkta omuz dirsek ve el bileği gibi bölgeleri tutar ve 24-48 saat içerisinde kaybolur. Tutulan bölgeler oldukça ağrılıdır ve eklem hareketlerini kısıtlayabilir. Kısmen kızarıklık ve ısı artışı gözlenebilir. Ataklar hafif travmalarda ve yoğun efor sarf edilen yürüyüşlerle daha çok ortaya çıkar. Synoviyal sıvı steril ve nötrofil içeriği açısından oldukça zengindir (Alp ve ark., 1998). Yetişkinlerin %6'sında 1 aydan uzun süren özellikle diz ve ayak eklemlerini tutan kronik artiküler ataklar kaydedilmiştir. Ateşin eşlik ettiği ataklarda alt ekstremitelerin büyük eklemlerinde şiddetli ağrı gözlenir (Salai ve ark., 1993).

2.6.5. Kas Ağrıları

AAA'da çocuk hastaların %10'unda orta derecede kas ağrısı gözlenmektedir. Özellikle bacaklarda diz altı bölgesinde fiziksel egzersiz sonrası 1 gün ve daha az süreli ağrılar oluşur. İlk kez Langevitz ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada AAA hastalarında fibril miyalji sendromu tanımlanmıştır. Bu sendrom periton irritasyonu olmaksızın karın ağrısı, artmış ateş, miyalji, yüksek sedimentasyon oranı, lökositöz ve hiperglobulunemi ile kendini gösterir (Langevitz ve ark., 1994).

2.6.6. Deri Lezyonları

Erisipel benzeri eritem (ELE, erysipelas-like erythema) AAA'da karakteristik bir semptomdur ve bazen de ateş ve artrit ile birlikte oluşur. ELE pediatrik AAA hastalarında %28.3 oranında, omuzla boyun bölgesi arasında, yetişkinlerde diz ve ayakların üzerinde yada dirseklerde daha sık gözlenir (Alp ve ark., 1998). 24-48 saat içerisinde kendiliğinden kaybolur. Selülit ile karıştırılabilir ve yanlış tanı sonucu hastalar gereksiz yere antibiyotik tedavisine maruz kalabilirler. Histolojik incelemelerde bu lezyonlarda vaskülitin eşlik etmediği bir ödem görülmüştür (Barzilay ve ark., 2000).

2.6.7. Akut Skrotum

Erkeklerde testis torsiyonlarına benzeyebilen tunica vaginalis testisin inflamasyonu oluşabilir. Tek taraflı olarak ve eritomatöz skrotal ataklar şeklinde kendini gösterir. Ateş ve ağrı eşliğinde devam eder. Süre olarak birkaç saatle 4 güne kadar devam edebilir (Majeed ve ark., 2001).

2.6.8. İnfertilite

İnfertilite ile ilgili ilk rapor 1973 yılında Ismajovitch ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmadır. Bu grubun bulgularına göre tedavi edilmeyen 45 bayan AAA hastasından 15'inde ovülasyon disfonksiyonuyla birlikte primer infertilite gözlenmiştir (Ismajovitch ve ark., 1973). Ehrenfeld ve arkadaşları tarafından yapılan daha sonraki bir çalışmada uzun süre kolşisin tedavisi görmüş 36 bayanda yapılan incelemede benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak bu çalışmada hastaların %36'sında infertilite ve bunların da %46'sında ovülasyon disfonksiyonu saptanmıştır (Ehrenfeld ve ark., 1987).

Erkek infertilitesi ise daha çok hastalığın patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir. Nadirde olsa gözlenen akut orşitis ve skrotal ödem spermatogenez üzerine olumsuz etki yapabilmektedir. 2001 yılında yapılan bir çalışmada çok seyrek görülmekle birlikte Behçet hastalığına benzer şekilde testiküler amiloidozlu AAA hastalarında infertilite gözlenmiştir (Haimo-Kochman ve ark., 2001; Mijatovic ve ark., 2002). Kolşisin kullanımının da erkek infertilitesi üzerine etkili olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda uzun dönem ve yüksek doz (1-2mg/günde) kolşisin alan 150 erkek hastada oligospermi veya azospermi normal popülasyona göre sadece 2 bireyde oluşmuş, bu sonuç diğer testiküler patolojilere bağlanmıştır (Ben-Chetrit ve ark., 1998; Mijatovic ve ark., 2002).

2.6.9. İzole Fibril Ataklar

Özellikle çocuklarda 40 derece ateşin eşlik ettiği ağrısız ve bölgesel olmayan birkaç saat süren izole fibril ataklar oluşur. Bu fenomen sık sık viral enfeksiyonlarla karıştırılabilir ve hatalı tanıya sebep olur (Alp ve ark., 1998). Son çalışmalardan elde edilen bilgilere göre izole febril ataklar AAA'nın çocuklarda ilk belirtisi olabileceği öngörüsünü desteklemektedir (Padeh, 2005).

2.6.10. Vaskülit

AAA hastalarında vaskülit, etkilenmemiş popülasyona göre daha yüksek sıklıkta görülmektedir (Tekin ve ark., 2000). Hastaların % 2,7 ile 11'inde Henoch-Schonlein purpura (HSP) bildirilmiştir (Alp ve ark., 1998; Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). İsrailde yapılan bir çalışmada çocuklarda HSP oluşumunun ciddi bir nedeni olarak AAA gösterilmiştir (Sachs ve ark., 1987). Ayrıca erken yaş polyarteritis nodosa (PAN) hastalarında, geç başlangıçlılara göre daha sıklıkla AAA görülmektedir (Sachs ve ark., 1987; Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). AAA ve PAN atakları sırasında abdominal ağrı ve ateşin görülmesinin yanı sıra PAN hastalarında bunlara ilave olarak, hipertansiyon ve nefrit gözlenmektedir. AAA hastalarında çok nadir olarak mikroskobik hematüri ve çeşitli tiplerde glomerülonefrit varlığı da bildirilmiştir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005).

2.6.11.Amiloidoz

Tedavi edilmeyen AAA hastalarında sekonder tip amiloid A (AA) oluşur (Tekin ve ark., 2000; Ben-Chetrit ve Backenroth, 2001). Genellikle ağır bir proteinüri ile seyreder ve nefrotik sendrom ile sonlanır. Amiloidoz oranı kolşisinle tedavi gören kişilerde tam olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan bir çalışmada kolşisinle tedavi gören 704 çocuktan sadece 1 tanesinde sekonder tip amiloidoz saptandığı bildirilmiştir (Padeh, 2005). Ülkemizde amiloidoz farklı oranlarda saptanmakla birlikte, 425 çocuğu içeren bir çalışmada 180 tanesinde rapor edilmiştir (Gillmore ve ark., 2001). Yine yapılan bir çalışmada amiloidoz oranı %12,7 olarak saptanmıştır. Bu düşük oran AAA hastalarında kolşisinle tedavisinden kaynaklanabilir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). Devam eden aile çalışmaları ışığında elde edilen bilgilere göre ailesinde amiloidoz görülen AAA hastalarının çocuklarında yaklaşık 6.04 kata kadar artmış risk hesaplanmıştır (Padeh, 2005). Amiloidozda kesin tanı biopsi ile konur. Böbrek dışında kalp, akciğer, karaciğer ve bağırsakları da tutabilir.

2.7. Laboratuvar Testleri

Bütün atak formlarında C-reaktif protein (CRP), fibrinojen, haptoglobulin, C3, C4 ve serum amiloid A (SAA) gibi akut faz reaktanlarında artış gözlenir. Eritrosit sedimentasyon hızı (erythrocyte sedimentation rate, ESR) ve lökosit sayısı artar. Gillmore ve arkadaşlarına göre CRP diğer inflamatuvar hastalıklar ile AAA kıyaslandığında, AAA ile daha düşük ilişkili bulunmuştur (Gillmore ve ark., 2001). ESR düzeyi ise AAA atakları sırasında pediatrik hastalarda ilk saatte 52±25 mm, pnömoni ve vaskülit gibi hastalıklarda ise 80–120 mm civarında bulunmuştur. Amiloidozlu hastalarda proteinüri ve bütün hastalarda mikroalbuminüri saptanmıştır (Padeh, 2005). Akut atak sırasında interlökin-1 ve tümör nekroz faktör gibi inflamasyon mediatörlerinin salınımı artarken, interferon aktivitesinin azaldığı ayrıca serozal sıvılarda C5a inhibitör aktivitesinde azalma olduğu saptanmıştır (Pras ve ark., 1992; Babior ve Matzner, 1997; Örün ve ark., 2002). Periton ve plevral sıvı protein, fibrin, lökosit zengin steril eksuda özelliğindedir. Bu bulguların tamamı ataklar arası dönemde çoğunlukla normal düzeylerde (Majeed ve ark., 2001). Bütün bu bulgulara rağmen AAA için spesifik bir laboratuvar testi henüz mevcut değildir.

Günümüzde AAA için biyokimyasal testlerden daha geçerli olan, moleküler genetik testler gittikçe önem kazanmaktadır. MEFV geninin klonlanmasıyla birlikte mutasyonların saptanması tanıya yönelik hızlı ve kullanışlı moleküler testlerin geliştirilmesi yönünde çalışmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Bu moleküler tanı testleri arasında kullanılan yöntemler ARMS, PCR/RFLP, Strip test ve DNA dizi analizi sayılabilir (Eisenberg ve ark., 1998; Gersoni-Baruch R ve ark., 1999; Ben-Chetrit ve ark., 2000; Oberkanins ve ark., 2003).

2.8. Ailevi Akdeniz Ateşi Tedavi ve Tanı Kriterleri

AAA'ya yönelik tedaviler 1973 yılına kadar ağrıyı hafifletmek veya kesmek yönünde yapılan girişimlerden ibaretti. 1972 yılında Goldfinger tarafından kolşisinle tedavi önerilmiş ve 1974 yılında Zemer ve ark.'nın çalışmalarıyla bu tedavi günümüze kadar en yaygın kullanılan yöntem olmuştur (Goldfinger, 1972; Zemer ve ark., 1974). Kolşisin metafazda mikrotübül sistemini etkiler, monosit ve nötrofil kemotaksisini azaltır ve lökosit degranülasyonunu inhibe eder (Bar-Eli ve ark., 1981).

Kolşisine günlük dozlar halinde genelde 1 mg ile başlanır, vücut ağırlığı ve yaşa bağlı olarak azaltılıp artırılabilir. Günlük dozların en fazla 1,5-2 mg'a kadar artırılabilmesi önerilmektedir. Bir araştırmada hem vücut ağırlığı hem de yüzeyi baz alınarak kolşisin dozu ayarlamasına gidilmiş ve $0,03 \pm 0,02$ mg/kg/gün veya $1,16 \pm 0,45$ mg/m²/gün önerilmiştir. Yine çocuklarda 5 yaşından küçüklerde 0,07 mg/kg/gün veya 1,9 mg/m²/gün kolşisin önerilmiştir. Bu doz 16 yaşından büyük çocuklarda 2,5 kata kadar yükseltilebilir (Gillmore ve ark., 1999). Bir günlük doz sonrası hastalardaki atakların % 65'inde kaybolma, hastaların % 35'inde kısmi azalma gözlenirken, % 5'inde ise ataklarda hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda proteinürisi olmayan hastalarda kolşisin tedavisi başlandıktan 30 yıl sonra dahi yapılan incelemelerde amiloidoz gözlenmediği bildirilmiştir (Zemer ve ark., 1974). Yine yapılan çalışmalarda 2 yaş altı AAA hastalarına yetişkinlere uygulanan kolşisin dozu verildiğinde toksik etkiler görülebileceği saptanmıştır. İki yaş altı AAA hastalarında diyare ve sıklıkla laktoz malabsorpsiyonu gözlenebilir. Bu durum ilacın gastrointestinal sisteme yapmış olduğu etkiden kaynaklanmaktadır (Fradkin ve ark., 1995). Kolşisinin uygun dozları hamilelik sırasında da hiçbir komplikasyona yol açmadan kullanılabilir (Ben-Chetrit ve Levey, 2003). Ancak nadir de olsa kolşisinin yan

etkileri sıralanacak olursa: karın ağrısı, bulantı, kusma, diyare, kemik iliği süpresyonu, periferik nöropati, myopati, alopesi, amenore, oligospermi, azospermi, ve anjionötik ödem sayılabilir. Düzenli kolşisin tedavisi hem atağın sıklığını ve şiddetini hem de amiloidoz gelişimini önler. Kolşisin tedavisi ile prognoz oldukça iyidir ancak tedavinin sürekliliği önemlidir.

Kolşisine cevap vermeyen yaklaşık % 5'lik hasta grubunda ise ya intravenöz kolşisin ya da alternatif ilaç olarak interferon alfa kullanılması önerilmektedir (Tunca ve ark., 1997; Lidar ve ark., 2003).

AAA, klinik tanı kriterlerine ve moleküler yöntemlere bakılarak tedaviye başlanan bir genetik hastalıktır. Klinik tanıyı koyma yönünde geliştirilmiş olan üç farklı kriterler grubu vardır. Bunlardan en geçerli ve kullanışlı olan Tel-Hashomer tanı kriterleridir (Livneh ve ark., 1997). Bu kriterden diğer ikisi Sohar kriterleri ve Dilşen kriterleridir (Sohar ve ark., 1967). Bunlar:

AAA için Sohar Kriterleri

- Kısa süreli ateş atakları
- Ateşe eşlik eden karın, göğüs, eklem ağrısı ve deri lezyonları
- İn-vivo ya da postmortem açıklayıcı başka bir durumun olmaması
- Heredofamilyal amiloidoz ve serumda amiloid- A protein varlığı
- Otozomal resesif kalıtıma uygunluk
- Akdeniz ülkelerinde gözlenme, özellikle Sefardik Yahudi ve Ermeni popülasyonlarından olmak.

AAA için Dilşen Kriterleri

Atak Komponentleri:

- Karın ağrısı
- Plevritik ağrı
- Periferik artrit

Diğer Özellikler:

- AA tipi amiloidoz
- Kolşisine iyi yanıt
- AAA için pozitif aile öyküsü

- Ek olarak tanı için ateş veya karın ağrısı mutlaka olmalı
- Kesin tanı için:2 atak komponenti veya 1 atak komponenti ve 1 diğer özellik olmalı

AAA için Tel- Hashomer Kriterleri

- **Major kriterler:**
- Peritonit, plevrit veya sinovitin eşlik ettiği tekrarlayan ateş epizodları
- Neden olmaksızın AA tipi amiloidoz
- Devamlı kolşisin tedavisine iyi yanıt
- **Minör kriterler:**
- Tekrarlayan ateşli ataklar
- Erisipel benzeri eritem
- Birinci derece akrabalarda FMF öyküsü
- ***Kesin tanı:2 major veya 1 major + 2 minör***
- ***Olası tanı:1 major+1 minör***

Ayırıcı Tanı

- Akut karın ağrısı
- Tekrarlayan pankreatit
- Porfiri
- Tekrarlayan pulmoner emboli
- Sistemik lupus eritematoz (SLE)
- Viral, bakteriyel enfeksiyöz nedenler
- Palindromik romatizma
- Septik artrit, kristal artrit

Tüm bunların yanı sıra AAA için günümüzde en yaygın ve kullanışlı tanı klinik açıdan değerlendirilen hastalara yapılan moleküler genetik testlerin ve kolşisin uygulaması ile alınan sonuçlardır. AAA'nın atipik semptomlarının değerlendirmesi Şekil 3'deki gibi yapılır (Booth DR ve ark., 2000; Livneh A ve ark., 2001).

{ SHAPE * MERGEFORMAT }

Şekil 3. AAA'nın atipik semptomlarının tanısı için bir akış şeması. İki mutasyonlu hastalara AAA tanısı konularak profilaktik kolşisin tedavisi önerilmelidir. Bir mutasyonlu hastalar ile mutasyon saptanmayan hastalar olası AAA hastası olarak düşünülmelidir. Son iki gruptaki

hastalar 6 aylık bir kolşisin tedavisine alınmalı ardından ilaç kesilmelidir. Olumlu yanıt alınan hastalar, AAA olarak tanımlanıp profilaktif kolşisin tedavisine devam edilmelidir. Kolşisine yanıt vermeyen grubun semptomlarının nedeni olarak diğer hastalıklar düşünölmelidir.

II. MATERYAL VE METOT

3.1.Kan Örneklerinin Toplanması

625 hasta, 150 hasta yakını ve 100 sağlıklı kontrolden EDTA içeren vakumlu tüplere 5 ml tam kan alındı. DNA'ların izolasyonu standart yöntemle "Salting out" yapıldı (Miller ve ark., 1988). Çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı. Ayrıca her örnek için hasta onam formları dolduruldu (Ek-1).

3.2.Kullanılan Cihaz ve Kimyasal maddeler

A) Cihazlar

- Termal döngü cihazı (Biolab, İngiltere, ABI/PRISM Applied Biosystems, U.S.A)
- Yatay elektroforez sistemi (Scie-Plas, İngiltere)
- Elektroforez güç kaynağı (Waaltec, Tayvan)
- UV transillumunator (Vilber Laurmat, Fransa)
- UV görüntü analiz sistemi (Biolab, İngiltere)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich, Almanya)
- Ben mari (Nüve, Türkiye)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- pH metre (Hanna, Almanya)
- Pastör fırını (Heraus, Almanya)
- Isıtıcı (Hotplate, Almanya)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya; Capp, Danimarka)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)
- Etöv (Dedeoğlu, Türkiye)

- İnkübasyon cihazı (Innogenetics, Avusturya)

B) Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma)
- Sükroz (Merck)
- Tris (Merck)
- EDTA, sodyum tuzu (Merck)
- SDS, Sodyumdodesilsülfat (Sigma)
- Etil alkol (Sigma)
- NaCl (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Magnezyum klorür (Merck)
- Borik asit (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Etidyum bromür (Sigma)
- Proteinaz-K (Stratagene)
- Taq DNA polimeraz enzimi (Takara, Bioron ve Fermentas)
- Restriksiyon enzimleri (Takara ve Fermentas)
- 10 X PCR buffer (Bioron, Takara ve Fermentas)
- Deksiribonükleosid trifosfatlar (dNTPs, Promega)
- PCR Primerleri (Iontek ve Fermentas)

3.3. Kullanılan Stok Solüsyonların Hazırlanması

A) 0.5M EDTA, pH 8.0

- 18.61 g disodyum EDTA.
- 80 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- Solüsyona 2 g NaOH tableti atılarak eritilir.
- pH 8'e ulaştığında bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Otoklavda steril edilir.
- Oda ısısında saklanır.

B) Doymuş NaCl (6M) Solüsyonu

- 7 gr NaCl.
- 20 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- Otoklavda steril edilir.
- Oda ısısında saklanır.

C) 1M Tris pH 7.5

- 12.11 g Tris-base.
- 80 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- pH HCl ile 7.5'a ayarlanır.
- Bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Otoklavda steril edilir.
- Oda ısısında saklanır.

3.4. Elektroforez Solüsyonları

A) 10X TBE (Stok solüsyon)

- 108 g Tris-base (0.9M).
- 55 g Borik asit (0.9M).
- 40 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 (20 mM).
- Tris-base ve borik asit 700 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- EDTA eklenir.
- Bidistile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.
- Oda ısısında saklanır.

B) 1X TBE (Çalışma solüsyonu)

- 100 ml 10X TBE stoktan.
- 900 ml bidistile H₂O eklenir.

C) Etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml)

- 1 g Etidyum bromür.
- 10 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- Işık almayan bir şişe içinde +4 °C'de saklanır.
- Stok solüsyondan, çalışma solüsyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlanır.

3.5. DNA İzolasyonu

3.5.1 DNA İzolasyon solüsyonları

Lizis Tamponu: 320 mM Sükroz (Merck)

10 mM Tris (Merck) pH 7.5

4 mM MgCl₂ (Merck)

%1 Triton X 100 (Sigma)

Distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlanır.

TEN tamponu : 10 mM Tris (Merck) pH 8

2 mM EDTA (Merck)

400 mM NaCl (Merck)

Distile suyla 50 ml'ye tamamlanır. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlanır.

Proteinaz K (Sigma) Solüsyonu :

10 ml 500 mM'lık Tris (pH 8) solüsyonu içine 100 mM'lık CaCl₂'den 0.1 ml ilave edilir ve 100 mg proteinaz K solüsyona eklenir. Bu şekilde 10 mg/ml proteinaz K solüsyonları hazırlanır.

% 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Merck):

10 gr SDS alınır ve 100 ml distile su içinde çözülür.

Doymuş NaCl Solüsyonu (6M) :

7 gr tartılıp, distile su ile 20 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanır.

%70 Etil alkol:

70 ml %99.5 etil alkol alınır ve 30 ml bidistile H₂O eklenir ve -20 °C'de saklanır.

TE Solüsyonu : 10 mM Tris pH 7.5

1mM EDTA

Hazırlamak için 500 mM Tris pH 7.5 stok solüsyonundan 1 ml, 100 mM EDTA stok solüsyonundan 0.5 ml alınır distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

3.5.2. DNA İzolasyon Yöntemi

I.Gün:

- 1.5 ml EDTA'lı tüm kan 50 ml'lik polipropilen tüpe alınır.
2. Kan örneğinin üç katı hacimde (15 ml) lizis tamponu konulur. Kapak kapatılıp kısaca çalkalanır.
3. 2200 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj yapılır. Üstteki süpernatant pastör pipeti ile atılır.
4. Lizis tamponu ile yıkama işlemi iki kez daha yapılarak üstteki süpernatant atılarak aynı devirde ve soğutmalı santrifüjde santrifüj edilir.
5. Son kez üstteki süpernatant atılır. Dipte kalan temiz çökelti üzerine 3 ml TEN tamponu konulup, kısa süre vortekslenir. Ardından 200 µl %10'luk SDS ve 50µl Proteinaz K ilave edilir ve elle tüpe yumuşak bir şekilde vurularak karıştırılır.
6. Bir gece 37°C'de inkubatörde hafif çalkalamayla inkübe edilir.

II.Gün :

7. İkinci gün örneklerin üzerine 1 ml 6 M'luk NaCl solüsyonundan konulur ve kısa bir süre vortekslenir.
8. 2600-2700 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılır.
9. Üstteki süpernatant 15 ml'lik bir tüpe alınıp, tekrar 3300 rpm'de oda ısısında 30 dakika santrifüj edilir.
10. Süpernatant başka bir 15 ml'lik bir tüpe alınıp (çökeltinin süpernatant karışmaması koşuluyla) bu kez çökelti atılır.
11. Süpernatantın iki katı hacimde absolü etil alkol ilave edilerek DNA çöktürülür.
12. Pastör pipeti ucu ile veya pipet ucu ile DNA alınır ve içinde 1 ml % 70 etil alkol bulunan Eppendorf tüpüne konulur.
13. 10 dakika mikrofüjde santrifüj yapıldıktan sonra üstteki alkol ince uçlu pastör pipeti ile çekilerek atılır. Çöktürülen DNA, tüplerin ağzı açık bırakılarak 37°C'de etüvde 10 dakika bekletilerek alkolün uçması sağlanır.
14. DNA örneği üzerine 150 µl TE tamponu ilave edilir ve tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 37°C'de etüvde çözünmesi için 1-2 saat bırakılır.

15. Örnekler çözüldükten sonra 10 µl stok DNA örneği, içinde 1 ml distile su bulunan Eppendorf tüpüne alınır. Karışım vorteksledikten sonra spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm’de optik yoğunluk ölçülerek DNA’nın miktarı ve saflığı tayin edilir.

16. Stok DNA örnekleri -20°C’de saklanır.

3.5.3. FMF StripAssay Yöntemi İçin DNA İzolasyonu Yöntemi

Kit İçeriği:

- Lizis tamponu A (25ml) (Lysis buffer A)
- Bağlama tamponu A (15 ml) (Binding buffer A)
- Ayırma tamponu D (15 ml) (Elution buffer D)
- EL tamponu (50ml) (Buffer EL)
- Proteinaz K (1 ml) (Proteinase K)
- Yıkama tamponu I (30 ml) (Wash Buffer I)
- Yıkama tamponu II (18 ml) (Wash Buffer II)
- 2 ml.’lik alıcı tüpler 50 adet) (Receiver –Tubes)
- 1.5 ml.’lik alıcı tüpler (50 adet) (Receiver –Tubes)
- Spin filtreler (50 adet) (Spin Filter)

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması ve Saklanma Koşulları:

- Kit açıldıktan sonra 1 ml distile su proteinaz K şişesine eklenir ve liyofilize halde bulunan enzim çözülür. Çözülen proteinaz K +4 °C’de 3 ay süreyle saklanabilir. Daha uzun sürede tüketilecekse çözülmüş olan enzim küçük miktarlara bölünerek -20 °C’de saklanabilir.

- Yıkama tamponu I (Wash Buffer I) solüsyonu içerisine 30 ml %99’luk ethanol eklenir.

- Yıkama tamponu II (Wash Buffer II) solüsyonu içerisine 42 ml %99’luk ethanol eklenir.

Çalışma Protokolü:

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü çıkartılır ve örnek isimleri işaretlenir.

2. 200 µl hasta serumu veya plazma tüplere eklenir, 200 µl lizis tamponu A ve 20 µl Proteinaz K eklenir ve vortekslenir.
3. Tüpler 56 derecede su banyosunda 10-15 dakika bekletilir.
4. Tüpler su banyosundan çıkartıldıktan sonra üzerlerine 200 µl bağlama tamponu A eklenir ve tekrar vortekslenir.
5. Tüplerin tüm içeriği Spin filter tüplerine aktarılır ve 1 dakika inkübasyona bırakılır. Ardından 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüjden alınan kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilir ve üzerlerine 500 µl yıkama tamponu I solüsyonu konup 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonrası kolonlar tekrar yeni toplama tüplerine aktarılır ve üzerlerine bu kez 800 µl yıkama tamponu II solüsyonu ilave edilir. 12.00 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılır.
8. Kolonlar son olarak toplama tüplerine konur ve 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
9. Santrifüjün ardından kolonlar steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir ve üzerine oda ısısında bekletilmiş ayırma tamponu D solüsyonundan 100-200 µl eklenir. Oda ısısında 3 dakika inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
10. Son olarak kolonlar mikrosantrifüj tüplerinden uzaklaştırılır ve alttaki bölüme geçen DNA örnekleri -20°C'de veya -80 °C'de saklanır.
11. Derin dondurucularda saklanan DNA örnekleri çalışma yapılmadan önce eritilir ve PCR için hazırlanır.

3.6. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Konsantrasyonu hesaplanacak olan stok DNA'lar derin dondurucudan çıkartılır ve oda ısısında ya da etüvde çözülmesi için bir müddet beklenir. Ölçümü yapılacak örnek adedi kadar 1,5 ml'lik eppendorf tüpleri üzerleri numaralandırılarak hazırlanır ve her tüpe 990 µl steril bidistile su konur. Bu tüplerin üzerine her bir stok DNA örneğinden ayrı ayrı 10 µl alınarak eklenerek elde edilen karışım kısa bir süre vortekslenir. Konsantrasyon ölçümü için 1 ml hacimli iki adet quartz tüp alınır. Bunlardan blank olarak kullanılacak olan 1. tüpe 1000 µl H₂O, ikinci tüpe ise 1000 µl'lik genomik DNA karışımı konur. Tüpler spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda okunduktan sonra DNA konsantrasyonu hesaplanır.

DNA Konsantrasyonu = (OD)₂₆₀ X Sulandırma katsayısı (100) x 50 µl/ml
(çift zincirli DNA'lar, için OD değeri)

Örneğin (OD)₂₆₀ için okunan değer 0,07 olsun.

DNA Konsantrasyonu= 0.07 X 100 X 50/1000 = 0.35 µg/µl (350 ng/µl)

İzole edilen DNA'nın saflığı ise OD₂₆₀/OD₂₈₀ formülüne göre saptanır. Bu oran temiz bir üründe 1.8-2.0 arasında beklenir. 2.0'in üzerindeyse RNA, 1.8'in altındaysa protein kontaminasyonu var demektir. 1.5'in altındaysa kirlilikten dolayı PCR çalışmasında DNA saflığına bağlı problemler ortaya çıkabilir. Ölçtüğümüz DNA'lardan çalışma solüsyonları hazırlayabiliriz. Konsantrasyonları 0.1 µg/µl (100 ng/µl) olacak şekilde hesaplanıp eppendorf tüplerine bölünerek, çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanabilir.

3.7. Kullanılan Moleküler Tanı Teknikleri

3.7.1 ARMS (Ampification Refractory Mutation System) Yöntemi

ARMS yöntemi genomik DNA'daki nokta mutasyonlarının, küçük delesyonların ve insersiyonların saptanmasında kullanılmaktadır. Yöntem 1989 yılında tanımlanmıştır ve birbirini tamamlayan iki reaksiyon basamağından oluşmaktadır. Bu reaksiyon basamaklarından ilkinde mutant diziyeye özgü, ikincisinde ise normal diziyeye özgü primerler kullanılır. Bu yöntemle hedef DNA bölgesinde mutasyon varlığı/yokluğu saptanır. Homozigot, heterozigot veya normal ayrımı ise her iki reaksiyonun sonuçları değerlendirildikten sonra yapılabilir (Newton ve ark., 1989). İki farklı reaksiyon tüpünde gerçekleştirilen yöntemde tüplerden birinde (I. tüp) normal diziyeye, diğerinde ise (II. tüp) mutant diziyeye özgün primer kullanılır. Her iki tüpte de ikinci primerler ortaktır (common primer). Her iki tüpte (tüp I ve II ayrı ayrı ve aynı kişiye ait genomik DNA'daki hedef gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan (amplifikasyon) sonra ürünler agaroz jel elektroforezde yürütülür. Çoğalma sadece I. tüpte gerçekleşmişse birey araştırılan mutasyon yönünden normal, sadece II. tüpte gerçekleşmişse homozigot mutant, her iki tüpte de gerçekleşmişse heterozigot olarak kabul edilir. Özetle, her genomik DNA ve mutasyon noktası için, iki farklı tüpte iki PCR ve toplam 3 farklı primer kullanılarak elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilir.

M694V, M680I ve V726A mutasyonlarının tespiti için gerekli primer dizileri Eisenberg ve ark.'nın kullandıkları primerlerden seçilmiştir (Eisenberg ve ark., 1998).

M680I, M694V ve V726A ARMS primer dizileri aşağıdaki gibidir:

M680I mutasyonunu saptamak için kullanılan primerler:

Ortak : 5'-TTA GAC TTG GAA ACA AGT GGG AGA GGC TGC-3'

Normal : 5'-ATT ATC ACC ACC CAG TAG CCA TTC TCT GGC GAC AGA GCC-3'

Mutant : 5'-ATT ATC ACC ACC CAG TAG CCA TTC TCT GGC GAC AGA GCG-3'

M694V mutasyonunu saptamak için kullanılan primerler:

Ortak : 5'-TGA CAG CTG TAT CAT TGT TCT GGG CTC TCC G-3'

Normal : 5'-TCG GGG GAA CGC TGG ACG CCT GGT ACT CAT TTT CCT TCC T-3'

Mutant : 5'-TCG GGG GAA CGC TGG ACG CCT GGT ACT CAT TTT CCT TCC C-3'

V726A mutasyonunu saptamak için kullanılan primerler:

Ortak : 5'-TGG AGG TTG GAG ACA AGA CAG CAT GGA TCC-3'

Normal : 5'-TGG GAT CTG GCT GTC ACA TTG TAA AAG GAG ATG CTT CCT A-3'

Mutant : 5'-TGG GAT CTG GCT GTC ACA TTG TAA AAG GAG ATG CTT CCT G-3'

ARMS Yöntemi ile M694V, M680I ve V726A mutasyonlarının belirlenmesi için yukardaki ARMS primerleri kullanılarak, bakılan 3 mutasyon için uygun reaksiyon karışımları ve konsantrasyonları Tablo 5'de, reaksiyon şartları ise Tablo 6'de verilmiştir.

Tablo 5. Optimum çoğalmanın gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı.

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
PCR tamponu (10 X)	2.5	2.5X PCR tamponu
MgCl	2	2 mM
Ortak primer (10 pmol/µl)	1.25	12.5 pmol
Normal/Mutant prime (10 pmol/µl)	1.25	12.5 pmol
dNTP'ler	0.40	0.2 mM
Genomik DNA (50 ng/µl)	2	100 ng
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2	1 U
Steril bidistile su	13,6 µl	
Toplam Hacim	25 µl	

Tablo 6. Çoğalmanın en iyi olduğu PCR programı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
-------------------	-------------	------	--------------

Başlangıç denatürasyonu	94	5 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	35
Primer bağlanması (Annealing)	61	30 sn.	
Zincir uzaması (Extension)	72	1 dk.	
Son uzama	72	7 dk.	1

3.7.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi şu şekilde yapıldı.

- 1- 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik bir erlenmayere kondu ve üzerine 100 ml 1X TBE tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında agar eriyene kadar yaklaşık 1,5 dakika tutuldu ve kaynatıldı.
- 2- Eriyen agar solüsyonu oda ısısında bekletilerek yaklaşık 75 °C'ye kadar soğutuldu ve 0.5mg/ml'lik etidyum bromür'den 100 µl ilave edildi.
- 3- Daha önceden tarakları, tabanda yaklaşık 1 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilen elektroforez kabına hazırlanan agaroz jel döküldü ve donması için oda sıcaklığında 20-30 dk. bekletildi.
- 4- Taraklar her iki uçtan tutularak dikkatlice çıkartıldı ve jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.
- 5- Jelde ortaya çıkan kuyucuklara total 12 µl olacak şekilde uygun DNA marker ve PCR ürünleri (10 µl PCR ürünü + 2 µl 6X yükleme tamponu) aktarıldı.
- 6- Elektroforez 125 volt'da ($12,5\text{volt}/\text{cm}^2$) 20-30 dakika süreyle yapıldı.
- 7- Ortaya çıkan bantlar UV transilluminatörde marker ve DNA'ların gittikleri mesafeler okunarak, DNA fragmanı uzunlukları hesaplandı. UV görüntü analiz sistemimizde sonuçlar kaydedildi.

3.7.3. PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi

Bu yöntem MEFV geni mutasyonlarının tanısında daha yaygın kullanım alanı bulmuş bir moleküler yöntemdir (Cazeneuve ve ark., 1999; Ben-Chetrit ve ark., 2000; Medlej-Hashim ve ark., 2000; Gersoni-Baruch ve ark., 2002). PCR/RFLP yöntemiyle

mutasyonun araştırılacağı gen bölgesi, mutasyonu içine alacak şekilde çoğaltılır. Çoğaltılan önceden bilinen uzunluktaki genomik DNA parçası, bakılacak mutasyona özgü olan restriksiyon endonükleaz enzimi yardımıyla kesilir, bu işlemden sonrada ortaya çıkan ürünler, DNA parçalarının büyüklüğüne göre agaroz ya da poliakrilamid jelde elektroforez işlemiyle yürütülür. Jel tercih edilen yöntemle bağı olarak hazırlanmadan önce veya elektroforezden sonra etidyum bromür ile boyanıp ardından ultra viyole (UV) ışıkta görüntülenir. Kesim noktalarına göre uzunlukları önceden bilinen parçalar değerlendirilerek mutasyonların varlığı ya da yokluğuna karar verilir.

Değerlendirme şu şekilde yapılır: hedef gen bölgesindeki nokta mutasyon, çoğaltılan DNA'da seçilen restriksiyon enziminin tanıma bölgesine özgülse mutasyonlu üründe kesim gerçekleşirken normal üründe kesim gerçekleşmez. Böylece kesilen ürünlere sahip bireyler mutasyona sahip diğerleri normaldir. Tam tersine restriksiyon enziminin tanıma bölgesi mutasyona özgül değil de normal olan ürüne özgül ise kesim normallerde gerçekleşir, mutasyon olanlarda kesim gerçekleşmez. Değerlendirmde kesim olan ürünlere sahip bireyler normal, olmayanlarsa mutasyona sahip olduğu şeklinde yapılır.

M680I, M694V ve V726A mutasyonlarının PCR/RFLP tekniği ile saptanması için için Gersoni-Baruch ve ark.'nın, M680I ve V726A mutasyonlarının saptanması için ise Ben-Chetrit ve ark.'nın çalışmalarındaki primerler kullanılmıştır (Gersoni-Baruch ve ark., 1999; Ben-Chetrit ve ark., 2000). M680I, M694V ve V726A PCR/RFLP yöntemi için kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir.

M680I ve V726A mutasyonlarını belirlemek için kullanılan primer çifti:

İleri (forward) primer: 5'-TGT ATC ATT GTT CTG GGC TCT-3'

Ters (reverse) primer: 5'-AGG GCT GAA GAT AGG TTG AA-3'

M694V mutasyonunu belirlemek için kullanılan primer çifti:

İleri (forward) primer: 5'-GAA TGG CTA CTG GGT GGA GAT-3'

Ters (reverse) primer : 5'-TGT CAC ATT GTA AAA GGA G-3'

M680I, M694V ve V726A mutasyonlarının PCR/RFLP yöntemi ile belirlenmesi için verilen primerler kullanılarak, bakılan 3 mutasyon için uygun

reaksiyon karışımları ve konsantrasyonları Tablo 7’de, reaksiyon şartları ise Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 7. Optimum çoğalmanın gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı

Reaksiyon Karışımı	Miktar (μ l)	Final Konsantrasyon
PCR tamponu (10 X)	2.5	2.5X PCR tamponu
MgCl	2	2 mM
İleri primer (10 pmol/ μ l)	1	10 pmol
Ters prime (10 pmol/ μ l)	1	10 pmol
dNTP’ler	0.40	0.2 mM
Genomik DNA (50 ng/ μ l)	2	100 ng
Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)	0.2 (2 μ l 1XPCR ile)	1 U
Steril bidistile su	14.1 μ l	
Toplam Hacim	25 μl	

(M680I ve V726A mutasyonları için PCR amplifikasyonu tek tüpte yapılabilir, toplam hacim 40 μ l olacak şekilde yapıldı).

Tablo 8. M680I, M694V ve V726A mutasyonları için uygun PCR programı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık $^{\circ}$ C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	5 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	35
Primer bağlanması	61	30 sn.	
Zincir uzaması	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

3.7.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi

M680I mutasyonunun belirlenmesi için Hinf I, M694V mutasyonu için Hph I ve V726A mutasyonu için de Alu I restriksiyon enzimi kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünlerin uygun tampon ve kesim enzimi ile karışım miktarları Tablo 9’da verilmektedir.

Tablo 9. M680I, M694V ve V726A mutasyonlarının RFLP reaksiyonu karışımları

Mutasyon çeşidi	RFLP enzimi	Uygun tampon	PCR ürünü	Bidistile su	Toplam
M680I mutasyonu	Hinf I 5 U	R tamponu 1.5µl (10X Tampon)	10µl	5µl	15µl
M694V mutasyonu	Hph I 5 U	B tamponu 1.5µl (10X Tampon)	10µl	5µl	15µl
V726A mutasyonu	Alu I 5 U	Y/Tanço 1.5µl 10X Tampon	10µl	5µl	15µl

Restriksiyon enzimi ile kesim işlemi için hazırlanan enzim ve PCR ürünü karışımı (toplam 15 µl) 37°C’de bir gece (12 saat) inkübasyona bırakılır. Görüntülemek için kesim ürünü üzerine 3 µl yükleme boyası (loading dye 6X) eklenerek daha önceden hazırlanmış olan % 2’lik agaroz jel veya % 2’lik nü mikropor jelde yürütülerek ortaya çıkan bantlar UV lambası ile görüntülenerek sonuçlar kaydedildi (Agaroz jel elektroforezi ARMS yönteminde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

3.7.5. FMF StripAssay Yöntemi.

StripAssay yöntemi MEFV geni mutasyonlarının tanısında son yıllarda yaygın kullanım alanı bulmuş bir analiz yöntemidir. Çünkü daha önce bahsettiğimiz diğer iki yöneme göre hem daha kısa sürede sonuç verme hem de daha fazla sayıda mutasyonun taranması açısından avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemde kit yöntemi ile izole edilen DNA kullanılır (www.viennalab.com).

Bakılan mutasyonlar MEFV genindeki 2. ekzonda bulunan E148Q, 3. ekzonda bulunan P369S, 5. ekzonda bulunan F479L ve 10. ekzonda bulunan M680I(G/C), M680I(G/A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S ile R761H’dir (Oberkanins ve ark., 2003). Mutasyon noktasını, bulunduğu ekzonu, kodonu, nükleotid değişim konumları ve amino asit değişimini gösteren bilgiler Tablo 10’da özetlendi (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infervers/>).

Tablo 10. Bakılan 12 mutasyon noktasıyla ilgili bilgiler

Mutasyon noktası	Bulunduğu ekzon	Kodon numarası	Nükleotid değişimi	Amino asit değişimi
E148Q	2	148	42G>C	Glu148Gln
P369S	3	369	1105C>T	Pro369Ser
F479L	5	479	1437C>G	Phe479Leu

M680I (G/C)	10	680	2040G>C	Met680Ile
M680I (G/A)	10	680	2040G>A	Met680Ile
IM692del	10	692	2076_2078del	Ile692del
M694V	10	694	2080A>G	Met694Val
M694I	10	694	2082G>A	Met694Ile
K695R	10	695	2084A>G	Lys695Arg
V726A	10	726	2177T>C	Val726Ala
A744S	10	744	2230G>T	Ala744Ser
R761H	10	761	2282G>A	Arg761His

Bu mutasyonları saptamak için çoğaltılan bölgeler multipleks PCR yöntemi ile elde edilmektedir. Yöntem şu şekilde uygulanır. Önce -20 °C’de saklanan DNA örnekleri oda ısısında çözülür. Hazır kit halinde gelen PCR reaktifleri oda ısısında ya da 37°C’de çözülür. Kit içerisinde Taq DNA polimeraz 5 U/µl, amplifikasyon karışımı [(Amplification Mix) içerisinde pirimer setleri, dNTP’ler, MgCl ve 10X PCR tamponu] ve Taq Seyreltme Tamponu (Dilution Buffer) bulunmaktadır. Reaksiyon karışımı Tablo 11’de verilmektedir.

Tablo 11. FMF StripAssay kit yöntemi için multiplex PCR içeriği.

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Amlifikasyon Karışımı	15 µl
Taq Seyreltme Tamponu	4,6 µl
Taq DNA polimeraz	0.4 µl (5 U/µl)
Genomik DNA (10 ng/µl)	5 µl
Toplam	25 µl

FMF StripAssay kit yöntemi (multipleks) için optimum çoğaltmanın gerçekleştiği PCR programı da Tablo 12’de verilmektedir.

Tablo 12. FMF StripAssay kit yöntemi için PCR (multipleks) programı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	2 dk.	1
Denatürasyon	94	15 sn.	35
Primer bağlanması	58	30 sn.	

Zincir uzaması	72	30 sn.	
Son uzama	72	3 dk.	1

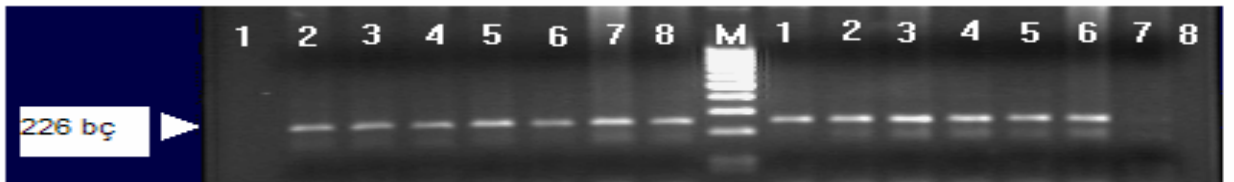
Toplam 25 µl olan PCR ürününden her bir örnek için 10 µl alındı ve üzerine 2 µl yükleme tamponu (6X) solüsyonu eklenerek karıştırıldı ve agaroz jel elektroforezi yapıldı. PCR sonucu elde edilen 318, 295, 236 ve 206 bp'lik DNA parçaları UV transillüminatörde görüntülenir. Ardından geriye kalan PCR ürününden 10 µl alınarak on iki mutasyona özel nitroselüloz yapıdaki "FMF stripleri" kullanılarak Auto LIPA (İnnogenetics) hibridizasyon cihazında hibridizasyon işlemi yapıldı. Hibridizasyon için kullanılan kimyasallar: hibridizasyon solüsyonu (45°C), yıkama solüsyonu A (45°C), yıkama solüsyonu B, konjugat solüsyonu, distile su ve renklendiricidir. Hibridizasyon işlemi yaklaşık 2 saat 15 dakika sürmektedir ve aynı anda 48 örnek çalışılabilmektedir (www.viennalab.com).

IV. BULGULAR

Biz çalışmamızı üç farklı grup üzerinde ve üç farklı moleküler teknikle yaptık. Birinci grup klinik olarak AAA tanısı konan ya da AAA şüphesi olan 625 hastadan oluşmaktadır. İkinci grup AAA tanısı konan hastaların kan bağı olan yakınlarından (165 kişi) ve son grup ise sağlıklı kontrollerden (100 kişi) oluşmaktadır. Hasta grubundaki tüm bireylere AAA'ya özgü klinik semptomları da içine alan birçok veri soruldu ve kaydedildi. Bu veriler şunlardır: yaş, cinsiyet, ilk semptom yaşı, atak sıklığı, ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı, eritem, göğüs ağrısı, amiloidoz, apandisit operasyonu geçirme, kolşisin kullanımı ve alınan cevap, yakınlarında AAA hastalığı varlığı, doğum yeri/köken. Akraba grubundaki ve kontrol grubundaki bireylerin ise yaş, cinsiyet ve doğum yeri/köken gibi bilgileri kaydedildi. Bütün bu bilgileri içeren veri tablosu Ek 1'de verilmektedir.

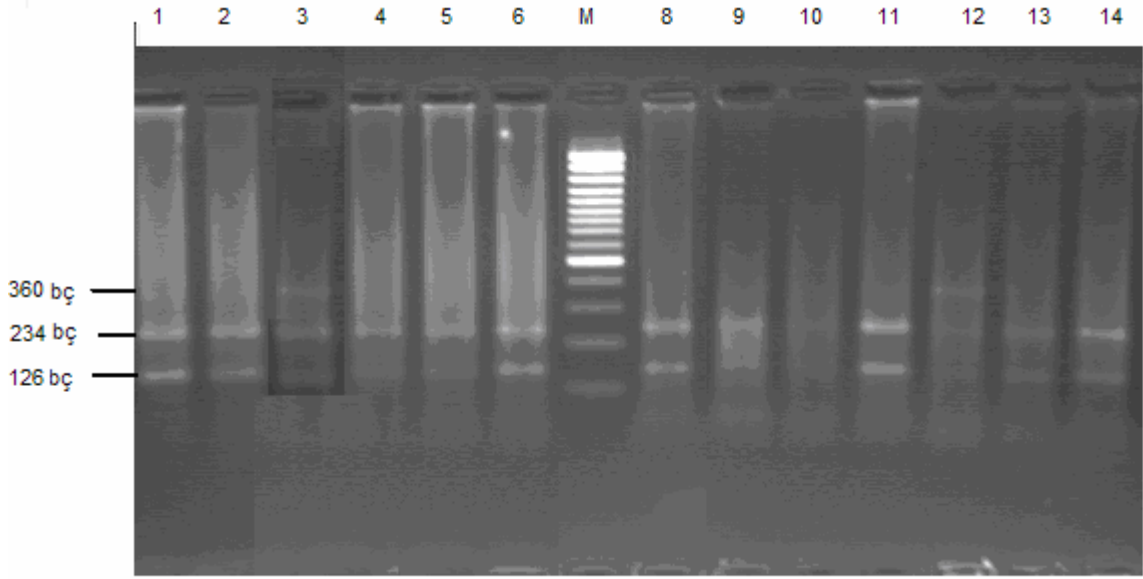
Çalışmamızda uyguladığımız moleküler genetik tanı teknikleri ise sırasıyla ARMS, PCR/RFLP ve "FMF StripAssay"dir. Bu tekniklerden ARMS ve PCR/RFLP 'yi toplam 400 örnekte uyguladık. Bulgularımız sırasıyla aşağıda verilmektedir.

ARMS yöntemi ile çalışılan örneklere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3'de verilmiştir. V726A için elde edilen PCR ürünü uzunluğu 226 baz çifti (bç)'dir ve pUC19 DNA/MspI marker kullanılmıştır.

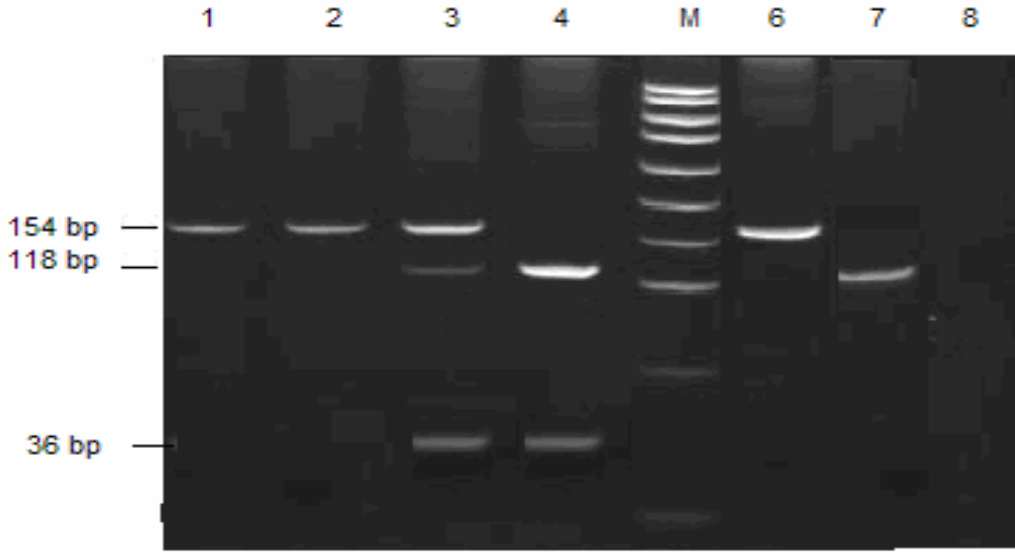


Şekil 3. ARMS tekniğiyle V726A mutasyonu tanısı. İlk 8 örnekte normal ve ortak diziye özgü primer çifti, ikinci 8 örnekte mutant ve ortak diziye özgü primer çifti kullanılarak yapılan ve aynı hastalara ait kalıp DNA'ların ARMS-PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüleri. V726A için 1. kuyudaki DNA örneği homozigot mutant, 2-3-4-5-6 nolu kuyulardaki DNA örnekleri heterozigot mutant, 7 ve 8 nolu kuyulardaki DNA örnekleri ise homozigot normal olarak gözlenmiştir.

PCR/RFLP yöntemi ile çalışılan örneklere ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir. M680I mutasyonu için Hinf I enzimi, M694V için Hph I enzimi ve V726A için Alu I enzimi kullanılmıştır.

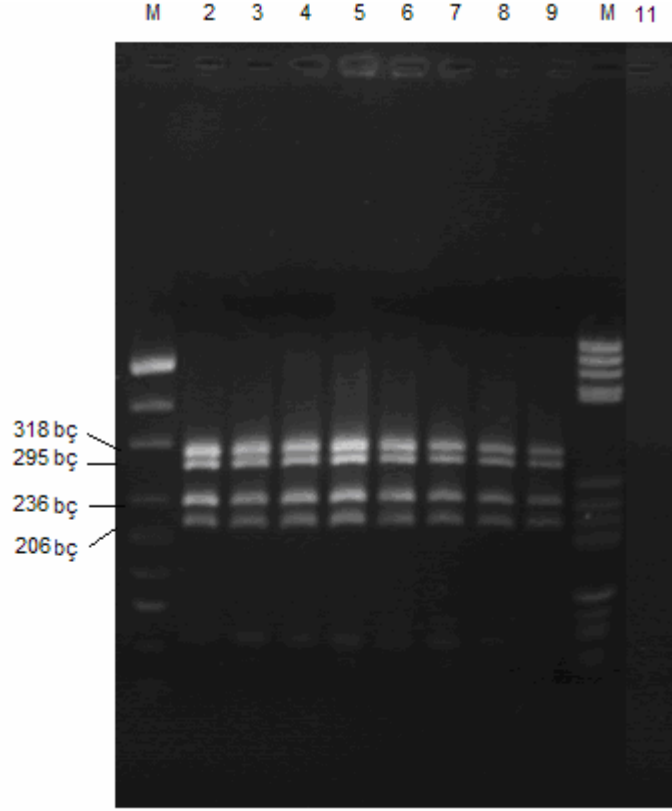


Şekil 4. PCR/RFLP tekniği ile M680I mutasyonunun tanısı. PCR ürününün Hinf I enzimiyle kesimi sonrası görüntüleri: 1-2-4-5-6-8-9-10-11-13-14 kuyulardaki örnekler normal (234-126 bç'lik bantlar); 3 ve 12 nolu kuyulardaki örnekler heterozigot (360-234-126 bç'lik bantlar).



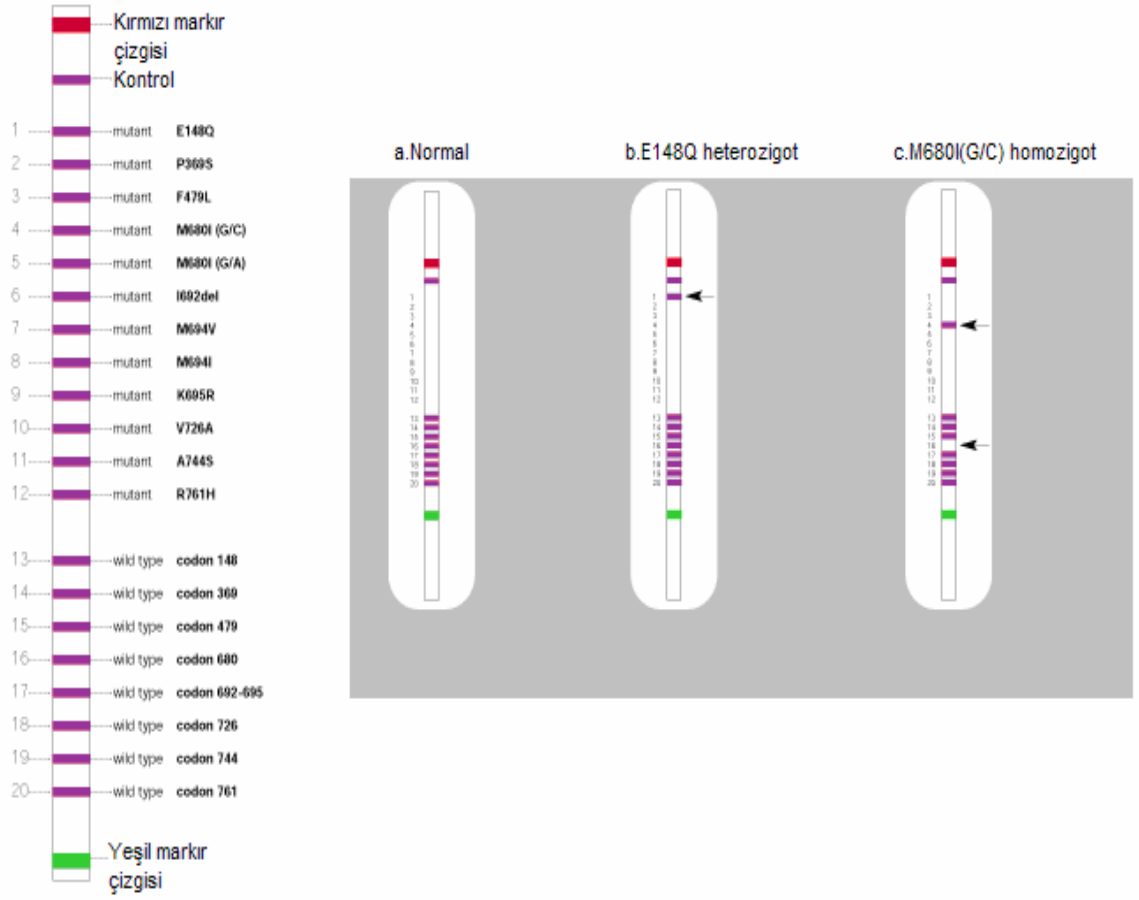
Şekil 5. PCR/RFLP tekniği ile M694V mutasyonunun tanısı. 1 ve 2 nolu kuyular normal (154 bç'lik bant), 3 nolu kuyu heterozigot (154-118-36 bç'lik bantlar), 4 nolu kuyu homozigot mutant (118-36 bç'lik bantlar), Marker (Puc19/Msp I) ve 8 nolu kuyu negatif kontrolü göstermektedir.

“FMF StripAssay” tekniği ile çalışılan multipleks PCR’la 4 farklı ekzonda (ekzon 2, 3, 5 ve 10) ilgili bölgeler çoğaltılır ve 318, 295, 236 ile 206 baz çiftlik DNA bantları elde edilir. Multipleks PCR ürünlerine ait % 2’lik agaroz jel görüntüsü Şekil 6’da verilmektedir.



Şekil 6. Multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1 nolu kuyu marker (pUC19 DNA/MapI HpaII), 2-9 nolu kuyulardaki DNA örneklerinde ekzon 2, 3, 5 ve 10'daki çoğaltılan bölgelere ait 318, 295, 236 ve 206 baz çiftlik DNA bantları. 10 nolu kuyu marker (QX174) ve 11 nolu kuyu negatif kontrol.

“FMF StripAssay” kit yönteminde nitroselüloz striplerin değerlendirilmesine ait örnek Şekil 7’de verilmiştir (<http://www.viennalab.com>).



Şekil 7. “FMF StripAssay” yöntemine ait test sonuçları (a. Normal: bütün mutant bantlar renk almamış ancak tüm normal bantlar boyanmış, b. E148Q heterozigot: bu mutasyon için hem mutant hem de normal bant boya almış, c. M680I(G/C) homozigot: yalnızca mutant bant boya almış ve normal karşılığı boya almamış).

Her üç tekniğin sonuçları açısından karşılaştırılması yapıldı. PCR/RFLP tekniği altın standart olarak kabul edildi. ARMS ve PCR/RFLP teknikleri arası uyum % 97 olarak hesaplandı. Strip ve PCR/RFLP teknikleri arası uyum ise % 100 çıktı. Uygulanan teknikler arası uyum sonuçları ve örnek sayısı ile ilgili veriler Tablo 13’de verilmektedir.

Tablo 13. Uygulanan tekniklerin sonuçları açısından karşılaştırılması

Uygulanan tekniklerin sonuçları açısından karşılaştırılması	Uygulanan kişi sayısı (N)	Uyum (%)
ARMS sonucu RFLP ile aynı	388	%97
ARMS sonucu RFLP den farklı	12	%3
STRIP sonucu RFLP ile aynı	163	%100
STRIP sonucu RFLP ile farklı	0	%0

Deney gruplarına uyguladığımız üç farklı tekniğin uygulanma adedi ile ilgili veriler Tablo 14’te verilmektedir.

Tablo 14. Uygulanan moleküler teknikler ve örnek sayısı

Yapılan test	Kişi sayısı (N)	Genel toplamdaki (n=890) Oran (%)
STRIP (A+R+S dahil)	727	81,6
A+R	400	44,94
A+R+S	163	18,3

AAA hasta grubunu oluşturan 625 örneğe ait bazı veriler (yaş, ilk semptom yaşı, teşhis yaşı, atak sıklığı) kaydedildi. Bu verilere ait bilgiler Tablo 15’te verilmektedir.

Tablo 15. Hastalara ait bazı veriler

Veri	Kişi sayısı (N)	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
Yaş	625	1	73	20,81	14,15
İlk semptom yaşı	625	1	51	12,62	10,14
Teşhis yaşı	625	1	63	18,96	12,92
Atak sıklığı (gün)	625	0	180	33,52	36,72

Hastalara ait klinik (ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı, eritem, göğüs ağrısı, amiloidoz varlığı, apandisit operasyonu geçirme durumu ve akrabalarda AAA hastalığı varlığı) özellikler kaydedildi. Bu özelliklerle ilgili yüzdeler Tablo 16’da verilmektedir.

Tablo 16. Hastaların* bazı klinik özelliklerinin gözlenme oranı

Klinik özellik	Yüzde (%)
Ateş	88
Karın ağrısı	90
Eklem ağrısı	76
Eritem	26
Göğüs ağrısı	25
Amiloidosis	5,4
Apandisit operasyonu geçiren	16
Yakınlarında AAA hastalığı	52

* (n=625 kişi)

Hastaları genetik tanı amacıyla Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderen klinikler, her bir klinikten gelen hasta sayısı ve yüzdeleri Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Hastaları gönderen klinikler ve örnek sayıları

Gönderen klinik	Kişi sayısı (N)	Oran(%)
Pediyatri	331	53
Dahiliye	257	41,2
Nefroloji	28	4,5
Fizik tedavi	3	0,5
Genel cerrahi	5	0,8
Toplam	625	100,0

Çalışmamızdaki hasta grubundaki 625 kişinin 346’sı kadın (% 55,4), 279’u erkektir (% 44,6). AAA akraba grubunda 165 ve sağlıklı kontrol grubumuzda 100 kişi vardır.Çalışmamızdaki bireylerin doğum yeri ve kökenleri kaydedildi. Burada anne ve babası ile aynı ilde doğan kişilerin doğduğu il, anne ve babası ile farklı yerde doğanların ise ailelerinin köken aldığı iller kaydedildi. Samsun ve coğrafi olarak en yakınında bulunan Ordu, Amasya, Tokat ile biraz daha uzak olan Trabzon doğumlu/kökenli kişi

sayısı, çalışmaya katılan toplam kişi sayısının 3/4'ünü oluşturmaktadır. Bireylerin doğum yeri/köken sayı ve oranları Tablo 18'de verilmektedir.

Tablo 18. Çalışmamızdaki bireylerin doğum yeri/kökenlerine göre dağılımı

Doğum yeri/köken	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Ağrı	2	0,32
Amasya	55	8,8
Ankara	6	0,96
Antalya	1	0,16
Ardahan	1	0,16
Artvin	6	0,96
Balıkesir	1	0,16
Bayburt	5	0,80
Bursa	1	0,16
Çorum	11	1,76
Denizli	1	0,16
Erzincan	4	0,64
Erzurum	4	0,64
Giresun	10	1,6
Gümüşhane	1	0,16
Isparta	3	0,48
İstanbul	3	0,48
Kastamonu	3	0,48
Kırşehir	2	0,32
Malatya	1	0,16
Mersin	1	0,16
Ordu	97	15,52
Rize	2	0,32
Samsun	303	48,48
Sinop	30	4,8
Sivas	3	0,48
Tokat	35	5,6
Trabzon	25	4
Yozgat	6	0,96
Zonguldak	2	0,32
Toplam=	625	100,00

AAA hastaları grubunda atak sıklığı kaydedildi. Hastalardan alınan bilgilerin oldukça değişken olması nedeniyle ortalama süreler soruldu. Bu süreler: sürekli, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 ve 180 gün olarak sınıflandırıldı. Atak sıklığı ve oranı ile ilgili veriler Tablo 19'de verilmektedir.

Tablo 19. Hastalarda gözlenen atak sıklığı ve oranı

Atak sıklığı (gün)	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Sürekli	6	0,96
7	91	14,56
10	6	0,96
15	175	28,00
20	4	0,64
30	208	33,28
45	44	7,04
60	49	7,84
90	13	2,08
180	29	4,64
Toplam=	625	100,0

AAA hastası grubunu oluşturan 625 bireyin tedavi amacıyla, yaşamlarının herhangi bir döneminde veya sürekli olarak kolşisin kullanıp kullanmadıkları ve kullannalarda kolşisine alınan yanıt soruldu. Kolşisin kullanımı ve alınan yanıt ile ilgili bilgiler Tablo 20’de verilmektedir.

Tablo 20. Hastalar arasında kolşisin kullanımı ve kolşisine yanıt oranları

Kolşisin kullanımı	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Kullanmıyor	363	58,1
Kullanıyor	262	41,1
Toplam	625	100,0
Kolşisine yanıt	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Yok	12	3,2
Var	253	96,8
Toplam	262	100,0

Hastalar klinik olarak Tel-Hashomer kriterlerine uyum açısından değerlendirildi. Tel-Hashomer kriterliri açısından kesin tanıya uyanlar, olası tanıya uyanlar ve uymayanlar şeklinde üç gruba ayrıldı. Bu üç gruptaki kişi sayısı ve oranları Tablo 21’de verilmektedir.

Tablo 21. Hastaların Tel-Hashomer kriterleri açısından değerlendirilme sonuçları

Tel-Hashomer kriterleri	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Tel-Hashomer kriterleri açısından (kesin tanı)	318	50,9
Tel Hashomer kriterleri açısından (Olası tanı)	307	49,1
Toplam	625	100,0

Moleküler genetik analizler sonucu elde edilen genotipler sınıflandırıldı. Bunlar: mutasyon saptanmayanlar, bir mutasyon saptananlar, iki mutasyon saptanan homozigotlar, iki mutasyon saptanan bileşik heterozigotlar ve 3 mutasyon saptanan kompleks allel taşıyanlardır. Genotip sınıfların 625 kişi içerisindeki dağılımı Tablo 22’de verilmektedir.

Tablo 22. Genotip sınıfların 625 kişide dağılımı

Genotip sınıflar	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
Mutasyon saptanmayanlar	151	24,16
Heterozigot (bir mutasyon saptanan)	186	29,76
Homozigot (iki mutasyon saptanan)	150	24
Bileşik heterozigot (iki mutasyon saptanan)	135	21,6
Üç mutasyon saptanan	3	0,48
Toplam	625	100,0

Yapılan moleküler testler sonucu 625 kişilik hasta grubunda 33 farklı genotip saptandı. 12 mutasyon çalışılan 499 kişilik hasta grubundaki bütün genotipler, sayıları ve bulunma oranları Tablo 23’te verilmektedir.

Tablo 23. Hasta grubuna ait genotip sonuçları

Genetik tanı	Kişi sayısı (N)	Oran (%)
normal	127	25,5
M694V/M694V	81	16,2
M694V/-----	80	16,0
M694V/M680I	46	9,2
M694V/V726A	11	2,2
M694V/E148Q	6	1,2
M694V/A744S	1	0,2
M694V/R761H	2	0,4
M680I/M680I	18	3,6
M680I/----	32	6,4
M680I/V726A	19	3,8
M680I/R761H	1	0,2
M680I/E148Q	4	0,8
V726A/----	11	2,2
V726A/F479L	3	0,6
V726A/E148Q	2	0,4
E148Q/----	19	3,8
E148Q/P369S	4	0,8
A744S/----	5	1,0
K695R/----	5	1,0
F479L/----	2	0,4
P369S/----	5	1,0
R761H/----	3	0,6
M694I/E148Q	3	0,6
E148Q/E148Q	1	0,2
E148Q/F479L	1	0,2
M680I(G/C)/M680I(G/A)	1	0,2
M694V/M694I	1	0,2
M694V/E148Q/P369S	1	0,2
E148Q/P369S/K695R	1	0,2
E148Q/M680I/M694V	1	0,2
M694V/P369S	1	0,2
V726A/K695R	1	0,2
V726A/R761H	1	0,2
Total	499	100,0

Moleküler genetik analiz sonuçları açısından homozigot/bileşik heterozigot olan bireyler ile heterozigot olan bireyler (enaz iki mutasyon çıkanlarla ile tek mutasyon çıkanlar) iki farklı genotip sınıfına ayrıldı. Değerlendirilen veriler (Kolşisin kullanımı, ateş , göğüs ağrısı, karın ağrısı, eklem ağrısı, apandisit operasyonu geçirme, eritem, amiloidoz, yakınlarında AAA hastalığı, kolşisine cevap, atak sıklığı, cinsiyet, ilk

semptom yaşı, Tel-hashomer kriterlerine uyum) ile genotip sınıfları arası ilişki araştırıldı.

Verilerin varlığı ve genotip sınıfları arasındaki fark istatistiksel olarak { **INCLUDEPICTURE "http://www.mnstate.edu/wasson/cssym.jpeg" * MERGEFORMATINET** } testi ile değerlendirildi ({ **INCLUDEPICTURE "http://www.mnstate.edu/wasson/cssym.jpeg" * MERGEFORMATINET** } değeri $p < 0,01$: çok önemli, $p < 0,05$: önemli ve $p > 0,05$: ise önemsiz olarak kabul edilmiştir). Değerlendirme sonuçları Tablolar 24-30'da verilmektedir.

Tablo 24. Enaz bir mutasyon çıkan hasta grubuna ve bazı parametrelere ait sonuçlar

Genotip Sınıfları	Kolşisin Kullanımı		Ateş		Göğüs Ağrısı		Karın Ağrısı		Eklem Ağrısı		Apandisit Operasyonu Geçirme		Eritem		Amiloidoz	
	Kullanmıyor	Kullanıyor	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var
Homozigot ve Bileşik Heterozigot (n=288)	130 (% 45,1)	158 (% 55,9)	25 (% 8,7)	263 (% 91,3)	207 (% 71,9)	81 (% 28,1)	17 (% 5,9)	271 (% 94,1)	56 (% 19,4)	232 (% 80,6)	234 (% 81,3)	54 (% 18,8)	182 (% 63,2)	106 (% 36,8)	267 (% 92,7)	21 (% 7,3)
Heterozigot (n=186)	131 (% 70,4)	55 (% 29,)	51 (% 27,4)	135 (% 72,6)	133 (% 71,5)	53 (% 28,5)	45 (% 24,2)	141 (% 75,8)	61 (% 32,8)	125 (% 67,2)	166 (% 89,2)	20 (% 10,8)	152 (% 81,7)	34 (% 18,3)	178 (% 95,7)	8 (% 4,3)
Toplam (n=474)	261 (% 55,1)	213 (% 44,9)	76 (% 16)	398 (% 84)	340 (% 71,7)	134 (% 28,3)	62 (% 13,1)	412 (% 86,9)	117 (% 24,7)	357 (% 75,3)	400 (% 84,4)	74 (% 15,6)	334 (% 70,5)	140 (% 29,5)	445 (% 93,9)	29 (% 6,1)
p değeri	p < 0,01		p < 0,01		p < 0,930		p < 0,01		p < 0,01		p < 0,019		p < 0,01		p < 0,185	

Tablo 25. Kolşisine cevap ve genotip sınıfları arasında ilişki

Kolşisine yanıt (var/yok)	Homozigot ve bileşik heteriozigot N (%)	Heterozigot N (%)	Toplam ve yüzde N (%)
Yok	3 (% 1,0)	5 (% 2,7)	8 (% 1,7)
Var	154 (% 53,5)	53 (% 28,5)	207 (% 43,7)v
Kullanmıyor	131 (% 45,5)	128 (% 68,8)	259 (% 54,6)
Toplam	288 (% 100,0)	186 (% 100,0)	474 (% 100,0)

Genotip sınıfları arasında kolşisine yanıt varlığı açısından fark oldukça önemlidir ($p < 0,01$).

Tablo 26. Atak sıklığı ve genotip sınıfları arasında ilişki

Atak sıklığı (gün)	Homozigot ve bileşik heteriozigot N (%)	Heterozigot N (%)	Toplam ve yüzde N (%)
Sürekli	1 (% ,3)	3 (% 1,6)	4 (% 0,8)
7	50 (% 17,4)	16 (% 8,6)	66 (% 13,9)
10	4 (% 1,4)	2 (% 1,1)	6 (% 1,3)
15	107 (% 37,2)	42 (% 22,6)	149 (% 31,4)
20	2 (% 0,6)	1 (% 1)	2 (% 0,8)
30	85 (% 29,5)	60 (% 32,3)	145 (% 30,6)
45	13 (% 4,5)	19 (% 10,2)	32 (% 6,8)
60	17 (% 5,9)	18 (% 9,7)	35 (% 7,4)
90	5 (% 1,7)	5 (% 2,7)	10 (% 2,1)
180	4 (% 1,4)	20 (% 10,8)	24 (% 5,1)
Toplam	288 (% 100,0)	186 (% 100,0)	474 (% 100,0)

Genotip sınıfları arasında atak sıklıklarının farklılığı açısından fark oldukça önemlidir ($p < 0,01$)

Tablo 27. İlk semptom yaşı ve genotip sınıfları arasında ilişki

Genotip	Örnek sayısı (N)	İlk semptom yaşı ortalaması
Homozigot ve bileşik heterozigot	288	11,51
Heterozigot	186	15,17
Toplam	474	12,50

Genotip sınıfları arasında ilk semptom yaşı açısından fark oldukça önemlidir ($p < 0,01$).

Tablo 28. Tel-Hashomer kriterleri ve genotip sınıfları arasında ilişki.

Tel-Hashomer kriterleri	Homozigot ve bileşik heterozigot N (%)	Heterozigot N (%)	Toplam ve yüzde N (%)
Tel-Hashomer kriterlerine uymayanlar	2 (% 0,7)	48 (% 25,8)	50 (% 10,5)
Tel-Hashomer kriterleri açısından kesin tanı	219 (% 76,0)	65 (% 34,9)	284 (% 59,9)
Tel-Hashomer kriterleri açısından olası tanı	67 (% 23,3)	73 (% 39,2)	140 (% 29,5)
Toplam	288 (% 100,0)	186 (% 100,0)	474 (% 100,0)

Genotip sınıflar arasında Tel-Hashomer kriterlerine uyum açısından fark oldukça önemlidir ($p < 0,01$).

Genotip sonucu en az iki mutasyon çıkanlar genetik açıdan hasta olması beklendiği için birleştirildi. Oluşan en az 2 mutasyon taşıyan yeni grup ile heterozigot ve normal çıkanların Tel-Hashomer kriterlerine uyum açısından değerlendirilmesi de Tablo 29’da verilmektedir.

Tablo 29. Genotip sınıfları ve Tel-Hashomer kriterlerine uyum

Genotip	Tel-Hashomer kriterlerine uyanlar (Kesin tanı grup) (N/%)	Tel-Hashomer kriterlerine uyanlar (Olası tanı grup) (N/%)	Toplam (N)
Normal	27 (% 8,6)	124 (% 39,7)	151
Heterozigot	65 (% 20,8)	121 (%38,8)	186
Homozigot + bileşik heterozigot	221 (% 70,6)	67 (% 21,5)	288
Toplam (%)	313 (% 100)	312 (% 100)	625

AAA hastalarının sağlıklı akrabalarından oluşan 165 kişilik grubumuzda ve sağlıklı kontrol grubumuzda mutasyon frekansı Tablo 30’da verilmektedir.

Tablo 30. AAA akraba ve kontrol grubundaki mutasyon sayıları

	Heterozigot mutasyon	Homozigot + bileşik heterozigot	Toplam mutasyon sayısı	Yüzde (%)
AAA Akraba (n=165)	77	26	139	% 42,12
Kontrol (n=100)	27	-	27	%13,5

V. TARTIŞMA

Biz çalışmamızda Samsun ve bölgesindeki popülasyonda, AAA hastalığında MEFV geni mutasyonlarının çeşitli moleküler yöntemlerle saptanmasını, akraba grubu ve sağlıklı kontrollerde mutasyon sıklığını hesaplamayı ve hastalarda fenotip-genotip ilişkilendirmesini yapmayı amaçladık.

AAA hastalığı Türkiyede yaklaşık 1/1000 gibi yüksek bir sıklıkta (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005) gözlenen ve taşıyıcı sıklığı 1/5'e kadar çıkan yaygın bir hastalıktır (Özen ve ark., 1988; Dinç ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001; Tunca ve ark., 2002). AAA otozomal resesif geçişli bir hastalıktır ve hastalık oluşumuna MEFV geni mutasyonları neden olmaktadır (Uluslararası FMF Konsorsiyumu, 1997; Fransız FMF Konsorsiyumu, 1997). MEFV mutasyonlarının saptanmasında ARMS, DGGE, PCR/RFLP ve DNA dizileme gibi moleküler tanı tekniklerinin geliştirilmesiyle hastalık tanısı daha kolay konur hale gelmiştir (Uluslararası FMF Konsorsiyumu, 1997; Fransız FMF Konsorsiyumu, 1997; Eisenberg ve ark., 1998).

Moleküler genetik tanı teknikleri ortaya konulana kadar AAA'da tanı yalnızca klinik bulgulara, ailesel kökene ve ilaca verilen yanıtı bakılarak konulmaktaydı. Bu durum hastalara hatalı tanı konulmasına yol açabilmektedir. Klinik bulguların hafif olduğu hastalarda ve fenotip II'de AAA tanısının geç konması amiloidoz gibi ciddi komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. AAA ateşle seyreden ve klinik açıdan oldukça benzerlik gösteren periyodik ateş sendromlarıyla (PFAPA, TRAPS, HIDS, CINCA/NOMID ve MWS ve FCUS) karışabilmektedir (Delpech ve Grateau, 2001; Kastner ve O'Shea, 2001; McDermot, 2002; Padeh 2005; <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>). Hastaların atak dönemlerinde gözlenen şiddetli karın ağrısı ve yüksek ateş gibi semptomlar apandisit şüphesiyle laparektomi geçirmelerine ve gereksiz tetkiklerin yapılmasına neden olabilmektedir. Hastalığın klinik açıdan karmaşık olması hem hekimin tanı koymasını güçlendirmekte hem de hastaya geç tanı konulmasına ve çok ciddi komplikasyonların (örneğin amiloidoz) fark edilmeden oluşmasına zemin hazırlamaktadır (Grateau ve ark., 2000). Bu durum aynı zamanda ciddi ek ekonomik kayıplara da yol açmaktadır.

Bütün bu özelliklerinden dolayı AAA hastalığının moleküler tanısı önemlidir. MEFV genindeki mutasyonların saptanması tanı konulmasında büyük avantaj sağlamaktadır. AAA moleküler tanısında kullanılacak testler ARMS, PCR/RFLP,

DGGE ve DNA dizi analizi sayılabilir. Bu testlerden en kapsamlı ve geçerlisi DNA dizi analizidir. Ancak diğerlerine göre hem daha uzun süren hem de daha yüksek maliyeti olan ve ekonomik sebeplerden dolayı henüz çok yaygın kullanım alanı bulamayan bir tekniktir. Biz bu testlerden ARMS, PCR/RFLP ve “FMF StripAssay” yöntemini kullandık.

Günümüzde AAA moleküler tanısında kullanılan standart bir test yoktur. Biz bundan yola çıkarak moleküler tanıda kullanılabilecek bu üç testle çalıştık ve aralarındaki tanıya yönelik avantaj ve dezavantajları inceledik.

Öncelikle ARMS ve PCR/RFLP yöntemiyle 400 örnek çalışarak hem testlerin birbiriyle uyumuna hem de tekniklerin avantajlarına baktık. Ardından bu gruptaki 163 örneği de içine alan 3. bir test tekniği olan “FMF StripAssay” yöntemi ile çalıştık. ARMS ve PCR/RFLP yöntemiyle M694V, M680I(G/C) ve V726A mutasyonlarına baktık. StripAssay yöntemi ile ise bu üç mutasyonu da içine alan toplam on iki mutasyona baktık.

Tekniklerin sonuçları Tablo 13’de verilmektedir. Bulgularımıza göre, kullandığımız üç moleküler yöntemden ikincisi olan PCR/RFLP yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, PCR/RFLP ile ARMS arasında % 97’lik uyum gözlenmiştir. ARMS tekniğindeki %3’lük uyumsuzluk yanlış negatif sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Çünkü ARMS da negatif mutasyon çıkan aynı örneklerin PCR/RFLP sonuçlarına baktığımızda pozitif çıktığını gözledik. Bu yanlış negatif sonuçlar incelendiğinde tüplerde PCR’ın gerçekleşmediği ve yalancı negatif sonuçların ortaya çıkmasına yol açtığı saptandı. Yanlış negatif sonuçları engellemek için ARMS PCR’ı sırasında ara (integral) kontrol kullanılması önerilebilir. Biz ARMS’la çalıştığımız tüm örnekleri PCR/RFLP yöntemiyle de çalıştığımız için geriye dönük (ara kontrol içeren) bir çalışma yapmadık. Yöntemler süre açısından kıyaslandığında ise ARMS, PCR yaklaşık 2 saat; RFLP, PCR 2 saat ve enzimle kesim 12 saat sürmektedir ve ARMS yöntemi süre açısından daha üstündür.

PCR/RFLP ile “FMF StripAssay” yöntemleri sonuçları kıyaslandığında ise % 100’lük bir uyum çıktı. Bu uyum beklendiği üzere ARMS yöntemi ile % 97 oranında çıktı. Bu sonuçlar “FMF StripAssay” yönteminin güvenilirliğini göstermektedir. “FMF StripAssay” yöntemi aynı zamanda daha hızlı olması (RFLP, PCR işlemi 1,5 saat ve enzimle kesim 12 saat, toplam 13,5 saat; Strip test, PCR işlemi 1,5 saat ve hibridizasyon

işlemi 2,5 saat, toplam 4 saat) ve on iki mutasyonu aynı anda taraması açısından daha üstündür.

AAA'da MEFV genindeki M694V, M680I(G/C) ve V726A mutasyonları ile yapılan çalışmalarda bu üç mutasyonun hastaların % 40-65'inde saptandığı bildirilmiştir (Uluslararası FMF Konsorsiyumu, 1997; Fransız FMF Konsorsiyumu, 1997; Eisenberg ve ark., 1998; Akar ve ark., 1999; Grateau ve ark., 2000; Yalçinkaya ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda 625 kişilik hasta grubunda üç mutasyon açısından bu oranı % 54,24 bulduk.

AAA hastalarında saptanmış olan ve en sık gözlenen mutasyonlar E148Q, M680I, M694V, M694I ile V726A mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar major mutasyonlar olarak kabul edilmektedir ve bunların içinde de en sık gözlenen M694V mutasyonudur (Akar ve ark., 1999; Yalçinkaya ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001; Balcı ve ark., 2002). Bu 4 major mutasyonun frekansını gösteren ve ülkemizde yapılan çalışmalarını özetleyen bazı çalışmalara ait verileri Tablo 4'te özetlemiştik. Ancak bu çalışmaların Türkiye'de yapılanları daha çok İç ve Batı Anadolu popülasyonlarını içeren araştırmalardır. Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu 3 ya da 4 mutasyonu içeren incelemelerdir. Bizim çalışmamız ise hem on iki mutasyonu analiz eden hem de % 75'inden fazlası Orta Karadeniz doğumlu popülasyonu inceleyen bir araştırmadır.

AAA hastalarında M694V mutasyonu sıklığını Akar ve ark.'ı % 43,5, Yalçinkaya ve ark.'ı % 41, Yılmaz ve ark.'ı % 51,55 oranında bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu oran % 33,76'dır. Bu sonuç diğer çalışmalarla kıyaslandığında daha düşüktür.

M680I mutasyonu sıklığını Akar ve ark.'ı % 12, Yalçinkaya ve ark.'ı % 16, Yılmaz ve ark.'ı % 9,22 oranında bildirmişlerdir (Akar ve ark., 1999; Yalçinkaya ve ark., 1999; Yılmaz ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda ise bu oran % 15,52 'dir. Bu sonuç diğer çalışmalarla kıyaslandığında, uyumlu görülmektedir.

V726A mutasyonu sıklığını Akar ve ark.'ı % 11,1, Yalçinkaya ve ark.'ı % 14, Yılmaz ve ark.'ı % 2,88 oranında bildirmişlerdir (Akar ve ark., 1999; Yalçinkaya ve ark., 1999; Yılmaz ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda ise % 4,96 oranı çıkmıştır. Bu sonuç Yılmaz ve ark.'nın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

AAA hastalarında 5 majör mutasyondan diğer ikisi olan E148Q ve M694I mutasyonları da sıklıkla çalışılmıştır. E148Q mutasyonunu Yılmaz ve ark.'ı % 3,55,

Yalçinkaya ve ark.'ı amiloidozlu grupta % 5,5 ve amiloidozsuz grupta % 5, Balcı ve ark.'ı amiloidozlu grupta % 4 oranında bildirmişlerdir (Yalçinkaya ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001; Balcı ve ark., 2002). Bizim 499 kişilik çalışmamızda ise bu oran % 4,4 çıkmıştır ve kısmen Yılmaz ve ark.'nın sonucuna yakındır. M694I mutasyonu oranı ise Akar ve ark.'ı % 2,8, Yalçinkaya ve ark.'ı % 17, Yılmaz ve ark.'ı % 0,44 oranında bildirmişlerdir (Akar ve ark., 1999; Yalçinkaya ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda ise % 0,4 oranında saptanmıştır ve bu oran da Yılmaz ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu çıkmıştır.

Bizim çalışmamızda 499 kişilik grupta, 4 majör mutasyonun toplam frekansı % 54,6 olarak bulundu. Diğer 8 mutasyonun frekansı ise % 4,3 (P369S % 1,2, F479L % 0,6, M680I(G/A) % 0,1, M694I % 0,4, K695R % 0,7, A744S % 0,6 ve R761H % 0,7) ve on iki mutasyonun toplam frekansı ise % 58,9 olarak saptandı.

Hasta grubumuzdaki mutasyon oranları için genel bir değerlendirme yaptığımızda daha önceki çalışmalara göre bazı farklı sonuçlar görüldü. Özellikle M694V mutasyon oranı başta olmak üzere genel toplamda mutasyon oranı kısmen daha düşük çıktı.

En az bir mutasyon taşıyan 474 hastanın % 60,26'sı homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyon taşıırken, % 39,24'ü heterozigot mutasyon taşımaktaydı.

AAA hastalarının sağlıklı akrabalarından oluşan 165 kişilik grubumuzdaki mutasyon frekansı oranı bağımsız allelerde % 42,12 bulunmuştur. Toplam 26 kişide homozigot ve bileşik heterozigot mutasyon saptanmıştır. Bu gruptaki homozigot çıkan 5 kişide klinik şikayetlerin olmamasının nedeni, bu kişilerin hasta olan yakınlarına göre daha küçük yaşta olmaları ve bundan dolayı da klinik semptomların henüz ortaya çıkmamış olması olabilir. Bileşik heterozigot çıkan 21 kişinin de klinik semptom göstermemesi anılan nedenlerden olabileceği gibi, mutasyonların aynı kromozom üzerinde bulunması nedeniyle de olabilir (mutasyon içermeyen normal bir kromozomun bulunması normal bir fenotip için yeterli olabilir).

Türk populasyonunda mutasyon frekansını Türk FMF Çalışma Grubu 1/5 olarak vermektedir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). Bizim çalışmamızda ise 100 kişiden oluşan kontrol grubumuzda 12 mutasyon tarandığında toplam 27 mutasyon saptandı. Toplam mutasyon frekansı bağımsız allelerde % 13,5 ve taşıyıcı frekansı %27 yani 1/3,7dir. Bu sonuç yapılan çalışmalara göre daha yüksek mutasyon frekansını

yansıtmaktadır (Ozen ve ark., 1988; Dinc ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2001; Tunca ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda hastaların % 87'den fazlası Samsun ve civarı illerde doğmuş ve Orta Karadeniz kökenlidir. Mutasyon frekansındaki bu farklı oran, daha önce bizim çalıştığımız popülasyonu yoğun bir şekilde içeren çalışmaların olmaması ve mutasyon frekansının tespit edildiği çalışmalar olmamasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızdaki hasta yaşı ortalaması 20,81 ve ilk teşhis yaşı ortalaması 18,96'dır. Türk FMF çalışma grubunun hasta yaşı ortalaması 23 ve ilk teşhis yaşı ortalaması 16,4'tür (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). Hasta yaşı ortalamamız hemen hemen aynıyken ilk teşhis yaşı ortalamamız farklıdır.

AAA hasta grubumuzda bazı klinik semptomların gözlenme oranları irdelendi. Bu kriterler seçilirken Tel-Hashomer kriterleri baz alındı ve birkaç ilave veriler de incelendi.

Yapılan bazı çalışmalarda Yahudi, Arap ve Ermeniler'de ateş semptomu % 100, peritonit % 82-96, plevrit % 40- 87, artrit % 37- 77 ve eritem %3- 46 oranında bulunmuştur (Sohar ve ark., 1967; Scwabe ve ark., 1974; Rawashdeh ve ark., 1996). Türk FMF çalışma grubunun sonuçlarında ise ateş % 92,5, peritonit 93,7, plevrit % 31,2, artirit % 47,4 ve eritem % 20,9 olarak bildirilmiştir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). Bizim çalışmamızda bu semptomlar sırasıyla ateş % 88, peritonit % 90, plevrit % 25, artrit % 76 ve eritem %26 oranında gözlenmiştir. Sonuçlar uyum göstermekle birlikte artrit Turk FMF çalışma grubunun sonuçlarından oldukça yüksek, ateş ise kısmen daha düşüktür.

İrdelemiş olduğumuz diğer verilerden amiloidoz Türk FMF çalışma grubunda % 12,9 bizim çalışmamızda ise % 5,4'dür. Bu sonuç kolşisin kullanımının yaygınlaşmasına veya amiloidozda ilave genetik faktörlerin (SAA gibi) bu popülasyonda daha az gözleniyor olmasından kaynaklanabilir.

AAA hasta grubumuzda klinik semptomlar ile genotip sonuçlarını uyum açısından değerlendirdik. Bu semptomlara ilave olarak hastalarda atak sıklığı ve apandisit operasyonu geçirme gibi faktörleri de sorguladık.

Klinik semptomları sorgularken genetik olarak hasta olduğu düşünülen ve genotipleri homozigot veya bileşik heterozigot çıkanları ayrı bir grup ve heterozigot çıkanları ise ikinci bir grup olarak seçtik. Böylece iki genotip sınıfı oluşturduk. Bu genotip sınıfları ile Tel-Hashomer kriterleri arasındaki uyumu irdeledik.

Bu iki genotip sınıflarında semptomların gözlenmesi açısından farklar şu şekilde bulundu. Homozigot/bileşik heterozigot genotip sınıfı, heterozigot genotip sınıfına göre ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı ve eritem varlığı, kolşisin kullanımı ve kolşisine yanıtları açısından fark istatistiksel anlamda oldukça önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Genotip sınıflarının hasta yakınları arasında AAA görülme oranı açısından farksa önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Hastalarda göğüs ağrısı ve amiloidoz olma açısından genotip sınıfları arası farksa önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Tel-Hashomer kriterleri semptomları dışında sorgulamış olduğumuz iki faktörden atak sıklığı en az iki mutasyonlu sınıfta hastaların % 84'ünden fazlasında 7–15–30 gün arayla tekrarlamaktadır. Bu sonuç genotip sınıfları açısından, istatistiksel olarak oldukça önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu sonuç atak sıklığının AAA hastalarında sorgulanması gereken önemli bir fenotipik kriter olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

İlk semptom yaşı ortalamaları en az iki mutasyonlu genotip sınıfımızda 11,57 iken heterozigot genotip sınıfımızda 15,17 çıkmıştır. Bu sonuç genotip sınıflar bakımından ilk semptom yaşı farkının istatistiksel açıdan oldukça önemli olduğunu göstermiştir ($p < 0,01$). Biz AAA hastalarında ilk semptom yaşının fenotipik kriterlere dahil edilebileceği sonucuna ulaştık.

Apandisit operasyonu geçirme açısından en az iki mutasyonlu sınıfta oran %18,8 ve heterozigot genotip sınıfında %10,8'dir. Oranlardaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu sonuç apandisit operasyonu geçirmenin de AAA hastalarında ilave bir kriter olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda cinsiyet oranlarına baktığımızda erkek: kadın oranı hasta grubumuzda 0,80 çıkmıştır. Türk FMF çalışma grubunun sonuçları ise 1,2'dir (Türk FMF Çalışma Grubu, 2005). Erkek: kadın oranı yapılan diğer çalışmalarda da erkekler lehine yüksek çıkmıştır. Bizim sonuçlarımız ile literatür sonuçları arasındaki bu farkı tartışmaya açık bir konu olarak değerlendirmekteyiz. Bize göre bu sonuç Samsun ve bölgesindeki popülasyonlarda kadın hastaların sağlık konusunda daha bilinçli olması sonucu tedavi amacıyla hastaneye erkeklere oranla daha çok başvurmasından kaynaklanabileceği gibi ilave genetik veya çevresel faktörlere (romatizmal hastalıkların yüksek olması gibi) sahip olmalarından da kaynaklanabilir.

Bilindiği gibi Tel-Hashomer kriterleri kendi içinde kesin tanı ve olası tanı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tel-Hashomer tanı kriterlerine uyum ve genotip sonuçlarını Tablo 40'a bakarak irdeleyebiliriz. Kesin tanılu grupta, en az iki mutasyon taşıyanlar % 70,6, heterozigotlar % 20,8 ve normal çıkanlar % 8,6 oranında bulunmaktadır. Olası tanılu grupta en az iki mutasyon taşıyanların % 21,5, heterozigot olanlar % 38,8 ve normal çıkanlar % 39,7 oranındadır. Tanı kriterlerine uyduğu halde heterozigot çıkanların ve mutasyon ıkmayanların genel toplamdaki oranı ise sırasıyla % 29,76 ve % 24,16'dır.

Bu sonuçlar yaptığımız testlerin % 70,6 oranında kesin tanılu ve %21,5 oranında olası tanılu AAA hastalarını genetik açıdan saptadığımızı göstermektedir. % 20,8'lik kesin tanılu grup ve normal çıkan % 8,6 lik grup tartışmaya açık bir konudur ve iki olası durum söz konusu olabilir. Birincisi bu gruplarda heterozigotlar ve normallerde en az bir ya da iki mutasyonun varlığının daha olabileceğini, bunun da DNA dizi analizi yöntemiyle saptanabileceğini düşünöyoruz. İkincisi olasılık daha zayıf olmakla birlikte, bu gruba giren bazı hastaların bir kısmı yanlış tanı konmuş ve özellikle diğer periyodik ateş sendromlarına sahip bireyler olabilir.

Yapılan testler olası tanılu grubun % 21,5'inde en az iki mutasyon saptayarak tanıya gidilmesine yardımcı olmaktadır. Heterozigot çıkan olası tanılu gruptaki % 38,8'lik gruba da kesin tanılu gruptaki heterozigot ve normal çıkanlar gibi DNA dizi analizi önerilebilir.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya 2001–2005 yılları arasında OMU Tıp Fakültesi polikliniklerinde AAA tanısı konan 625 hasta, birinci derece hasta yakınlarından oluşan 165 akraba ve sağlıklı kontrollerden oluşan 100 birey dahil edildi. Her örnekte MEFV mutasyonlarından en az 3 en fazla 12 mutasyona bakıldı. Bunlardan 400'ünde hem ARMS hem de PCR/RFLP tekniği kullanılarak 3 mutasyona bakıldı. 727'sinde "FMF StripAssay" yöntemiyle 12 mutasyona bakıldı. 163 kişide ise her üç teknikle bakıldı.

Sonuçlar:

- ARMS ve PCR/RFLP tekniği arasında %97'lik uyum vardır. % 3'lük fark ARMS tekniğindeki yalancı negatiflikten kaynaklanmaktadır. Bu dezavantaj ara kontrol kullanılarak giderilebilir. Süre açısından ARMS tekniği daha avantajlıdır.
- PCR/RFLP ve FMF StripAssay tekniği arasında %100'lük uyum gözlenmiştir. Tanıda her iki teknik de kullanılabilir ancak FMF StripAssay tekniği hem süre açısından hem de aynı anda on iki mutasyona birlikte bakabilmesi açısından daha avantajlıdır.
- ARMS ve FMF StripAssay tekniği arasında % 97 uyum vardır. Süre açısından ARMS daha avantajlı görünse de FMF StripAssay aynı anda on iki mutasyona birlikte bakabilmesinden dolayı daha kullanışlıdır.
- Hasta grubunda toplam 33 farklı genotip bulundu. Bu genotipler homozigot, bileşik heterozigot, kompleks heterozigot ve heterozigotlardan oluşmaktadır.
- Bizim çalışmamız Samsun ve bölgesindeki hasta popülasyonunda MEFV gen mutasyonlarının taranması açısından yapılan ilk çalışmadır ve bağımsız allelerde bakılan 12 mutasyonun frekansı % 60,01'dir. Mutasyon frekansı ülkemizde yapılan diğer tek merkezli çalışmalardan daha düşük bulundu. Biz bunun nedenini çalışma popülasyonumuzun genişliğine ve kısmen farklı bir popülasyona ait hastaların dahil edilmesine bağlıyoruz.
- M694V mutasyonu frekansı % 33,76 bulundu. Bu oran Türkiye'de yapılan diğer çalışmalardaki oranlara göre daha düşüktür. Bu sonucu çalıştığımız popülasyona

özgü bir sonuç olarak değerlendirebileceğimiz gibi hasta sayısının fazla olması ve bu yüzden daha gerçekçi oranı yansıtması da söz konusu olabilir.

- Genotip-fenotip çalışmamızın sonuçları bu konudaki çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ancak ilave bir sonuç olarak AAA hastalarında atak sıklığı, ilk semptom yaşı ve apandisit operasyonu geçirme durumlarının sorgulanması istatistiksel anlamda önemli çıkmıştır (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,01$ ve $p < 0,05$) ve heterozigotların tanısına katkı yapabilir.
- Samsun ve bölgesindeki AAA hasta popülasyonunu kapsayan bu çalışmada toplam hasta içindeki cinsiyet oranı diğer bölgelerde yapılan çalışma sonuçlarından farklı çıkmıştır. % 55,4 bayan ve % 44,6 erkek oranı (0,80) bulunmuştur.
- İlk teşhis yaşı ortalaması 18,96 bulunmuştur ve bu ortalama benzer çalışmalara bakıldığında daha yüksektir.
- Amiloidoz gözlenme oranı % 5,4 ve benzer çalışmalara göre biraz düşüktür.
- Akraba grubu çalışmamızda mutasyon oranı % 42'dir ve bunların % 15,75'i homozigot veya bileşik heterozigot mutasyon saptadık.

Öneriler:

- Şuan için "FMF StripAssay" yöntemi diğer iki yönteme göre daha ekonomik ve 12 mutasyonu taraması nedeniyle avantajlı olduğu için önerilebilir. Ancak en azından heterozigot çıkanlarda DNA dizi analizi yapılması uygundur.
- AAA'ya ait fenotipik özellikler içerisine atak sıklığı, ilk semptom yaşı ve apandisit benzeri şikayetler eklenebilir. Bölgemizde kadınlarda AAA hastalığının beklenenden fazla çıkmasının nedenleri araştırılabilir.
- Ailevi Akdeniz Ateşi Türkiye'de oldukça sık rastlanan bir genetik hastalıktır bu yüzden moleküler tanısı mutlaka yapılmalı öncelikle hasta ve yakınlarına genetik danışma verilerek toplumumuz korunmalıdır.
- Erken tanı ve tedaviye başlangıç AAA'inde oldukça önemlidir. Amiloidoz gibi komplikasyonların gelişimini önler, hasta ve hekimi rahatlatır.
- Genotip sonucu en az 2 mutasyonlu çıkan hastalarda akraba grubuna mutasyon taraması önerilebilir.
- Ayrıca minör mutasyonların oranı % 4,3 çıktı ve bu mutasyonların da taranması önerilebilir.

VIII. KAYNAKLAR

- Akar, N., Mısırlıoğlu, M., Yalçınkaya, F., Akar, E., Çakar, N., Tümer, N., Akçakuş, M., Taştan, H., Matzner, Y. (1999). MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Hum Mutat*, **288**: 1-5.
- Aksentijevich, I., Torosyan, Y., Samuels, J., Centola, M., Pras, E., Chae, J.J., Oddoux, C., Wood, G., Azzaro, M.P., Palumbo, G., Giustolisi, R., Pras, M., Ostrer, H., Kastner, D.L. (1999). 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*, **64**: 949-962.
- Alp, H., Tan, H., Orbak, Z., Selimoğlu.(1998). Ailevi Akdeniz Ateşi. *Sendrom*, 10(9): 64-69.
- Bakkaloğlu, A. (2003). Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol*. **8**: 53-859
- Balci, B., Tinaztepe, K., Yilmaz, E., Gucer, S., Ozen, S., Topaloglu, R., Besbas, N., Ozguc, M., Bakkaloglu, A. (2002). MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever phenotype II patients with renal amyloidosis in childhood: a retrospective clinicopathological and molecular study. *Nephrol Dial Transplant*. **17(11)**:1921-3.
- Babior, B.M. and Matzner, Y. (1997). The familial Mediterranean fever gene-cloned at last. *N. Engl. J. Med.* **21** : 1548-1549
- Bar-Eli, M., Ehrenfeld, M., Levy, M., et al. (1981). Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Am J Med Sci*, **281**: 15-18.
- Barzilai, A., Langevitz, P., Goldberg, I., et al. (2000). Erysipelas-like erythema of familial Mediterranean fever: clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol*. **42(5 Pt 1)**:791 –5.
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. (1998). Familial Mediterranean fever. *Lancet*, **998**; 351: 659-664
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. (1990). Autoantibodies in familial Mediterranean fever (recurrent polyserositis). *Br J Rheumatol*, **29**: 459-461.
- Ben-Chetrit, E., Lerer, I., Malamud, E., Domingo, C., Abeliovich, D. (2000). The E148Q mutation in the MEFV gene: Is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat*, **15(4)**: 385- 386.
- Ben-Chetrit, E., Backenroth, R. (2001). Amyloidosis induced, end stage renal disease in patients with familial Mediterranean fever is highly associated with point

- mutations in the MEFV gene. *Ann Rheum Dis.* **60**: 146-149
- Ben-Chetrit, E., Levy, M. (2003). Reproductive system in familial Mediterranean fever: an overview. *Ann Rheum Dis* **62(10)**:916– 9.
- Cazeneuve, C., Sarkisian, T., Pecheux, C., Dervichian, M., Nedelec, B., Reinert, P., Ayvazyan, A., Kouyoumdjian, J.D., Ajrapetyan, H., Delpech, M., Goossens, M., Dode, C., Grateau, G., Amselem, S. (1999). MEFV gene analysis in Armenian patients with familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet*, **65**: 88-97.
- Cazeneuve, C., Ajrapetyan, H., Papin, S., Roudot-Thoraval, F., Genevieve, D., Mndjoyan, E., Papazian, M., Sarkisian, A., Babloyan, A., Boissier, B., Duquesnoy, P., Kouyoumdjian, J.C., Girodon-Boulandet, E., Grateau, G., Sarkisian, T., Amselem, S.(2000). Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet.* **67(5)**:1136-43.
- Chen, X., Fishel-Ghodsian, N., Hamon, M. (1998). Assessment of pyrin gene mutations in Turks with familial Mediterranean fever. *Hum. Mutat.* **11**: 456-460
- Delpech, M. and Grateau, G. (2001). Genetically determined recurrent fevers. *Current Opinion in Immunology*, **13**: 539-542
- Doğanavşargil, E., Keser, G.(1999). Familial Akdeniz Ateşi. *Klinik Romatoloji, İstanbul, Deniz Matbaası, Ege Romatoloji* : 467-474.
- Diaz, A., Hu, C., Kastner, D.L., Schaner, P., Reginato, A.M., Richards, N., Gumucio, D.L. (2004). Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal bölge that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* **50(11)**:3679-89.
- Dinc, A., Pay, S., Turan, M., Simsek, I. (2000). Prevalence of familial Mediterranean fever in young Turkish men [abstract]. *Clin Exp Rheumatol.* **18**:29
- Ehrenfeld M., Brezinski A., Levy M. and Eliakim M. (1987). Fertility and obstetric history in patients with familial Mediterranean fever on long-term colchicine therapy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **94**: 1186-1191
- Eisenberg, S., Aksentijevich, I., Deng, Z., Kastner, D.L., Matzner, Y. (1998). Diagnosis of familial Mediterranean fever by a molecular genetics method. *Ann Intern Med*, **129**: 539-542.
- Erken, E., (1996). Familial Akdeniz Ateşi. *Klinik Romatoloji, Ankara, Hekimler Yayın Birliği*, 263-268.
- Erken, E., Güneşçar R, Özbek S, Konca K. (1996). Serum soluble interleukin 2 receptor levels in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, **55**: 852- 855.

- Fairbrother, W.J., Gordon, N.C., Humke, E.W., O'Rourke, K.M., Starovasnik, M.A., Yin, J.P., Dixit, W. (2001). The pyrin bölge: a member of the death bölge-fold superfamily. *Protein Sci*; **10(9)**: 1911-1918
- Fradkin, A., Yahav, J., Zemer, D., et al. (1995). Colchicine-induced lactose Malabsorption in patients with familial Mediterranean fever. *Isr J Med Sci*; **31(10)**:616– 20.
- Gersoni-Baruch, R., Kepten, I., Shinawi, M., Brik, R. (1999). Direct detection of Common mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) using naturally occurring and primer mediated restriction fragment analysis. *Hum Mutat*, **14(1)**: 91-94.
- Gersoni-Baruch, R., Shinawi, M., Leah, K., Badarnah, K., Brik, R.(2001). Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet*, **9(8)**: 634-637.
- Gersoni-Baruch, R., Brik, R., Shinawi, M., Livneh, A. (2002). The differential Contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever: *Eur J Hum Genet*, **10(2)**: 145-149.
- Gillmore, J.D., Lovat, L.B., Persey, M.R., et al. (2001). Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. **358(9275)**:24– 9.
- Goldfinger, S.E., (1972). Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Eng J Med*, **287**: 1302.
- Grateau, G., Pecheux, C., Cazeneuve, C, Cattan, D., Dervichian, M., Goossens, M., Delpuch, M., Amselem, S., Dode, C. (2000). Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *QJ Med*, **93**: 223-229.
- Ismajovitch, B.,Zemer D., Revach M., Serr D., Sohar E. (1973). The causes of infertility in females with familial Mediterranean fever. *Fertil. Steril*. **24**: 844-847
- Jack, J.C.W., Mather, I.H.(1990). 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*, **265**: 14481-14486.
- Kastner, D.L., Aksentjevich, I., Gruberg, L., Balow, J., Dean, M., Hampsch, K., Gazit, E., Kovo, M., Pras, M. (1991). Familial Mediterranean fever: a 90 markers exclusion map and evidence for linkage to chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet*, **58**: 2115
- Kastner, D.L. Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. Koopman WJ (Ed). (2001). *A Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Lippincott Williams and

- Wilkins, 1400-1441.
- Kastner, D.L. and O'Shea J. (2001). A fever gene comes in from the cold. *Nature*, **29**; 241-242.
- Kees, S., Langevitz, P., Zemer, D. et al. (1997). Tel Aviv: pericarditis as a rare manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). In: Sohar, E., Gafni, J., Pras, M., editors. *Familial Mediterranean fever*. Tel Aviv, Israel: Freund Publishing House. p. 129–31.
- Keven, K., Şengül, S., Kutlay, S., Ekmekçi, Y., Anadol, E., Nergizoğlu, G., Ateş, K., Erturk, S., Erbay, B. (2004). Long-Term Outcome of Renal Transplantation in Patients With Familial Mediterranean Fever Amyloidosis: A Single-Center. Transplantation *Proceedings*, **36**, 2632-2634.
- Kogan, A., Shinar, Y., Lidar, M., Revivo, A., Langevitz, P., Padeh, S., Pras, M., Livneh, A. (2001) Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet*. **102**:272–276.
- Kotone-Miyahara, Y., Takaori-Kondo, A., Fukunaga, K., et al. (2004). E148Q/M694I mutation in 3 Japanese patients with familial Mediterranean fever. *Int J Hematol* **79**(3):235–7.
- La Regina, M.N.G., Diaco, M., Procopio, A. et al. (2004). Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* **12**(2):85 –6.
- Langevitz, P., Zemer, D., Livneh, A. et al. (1994). Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatology*. **21**:1708–9.
- Levy, E.N., Shen, Y., Kupelian, A., Kruglyak, L., Aksentijevich, I., Pras, E., Balow, J.E., Linzer, B., Chen, X., Shelton, D.A., Gumucio, D., Pras, M., Shohat, M., Rotter, J.I., Fischel-Ghodsian, N., Richards, R.I., Kastner, D.L. (1996). Linkage disequilibrium mapping places the gene causing familial Mediterranean fever close to D16S246. *Am J Hum Genet*, **58**: 523- 534.
- Lidar, M., Kedem, R., Langevitz, P. et al. (2003). Intravenous colchicine for treatment of patients with familial Mediterranean fever unresponsive to oral colchicine. *J. Rheumatol* **30**(12):2620–3.
- Lightfoot, R.W., Mc Carty, D.J., Koopman, W.J. (1993). Intermittent and Periodic Arthritic Syndroms. *Arthritis and Allied Conditions*. **2**: 1121-1137.
- Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S., Pras, M. (1997) Criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, **40**: 1879-1885
- Livneh, A., Langevitz, P., Shinar, Y., Zaks, N., Kastner, D.L., Pras, M., Pras, E. (1999) MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial

Mediterranean fever. *Amyloid*. **6**:1–6.

Livneh, A., Aksentijevich, I., Langevitz, P. et al. (2001). A single mutated MEFV allele in Israeli patients suffering from familial Mediterranean fever and Behcet's disease (FMF–BD). *Eur J Hum Genet* **9**:191–6.

Lucotte, G., (2001). Study of the Mutation M694V of familial Mediterranean fever in Jews. *Genetic Testing*, **5**:53-56

Mansour, I., Delague, V., Cazeneuve, C., Dode, C., Chouery, E., Pecheux, C., Medlej-Hashim, M., Salem, N., El Zein, L., Levan-Petit, I., Lefranc, G., Goossens, M., Delpech, M., Amselem, S., Loiselet, J., Grateau, G., Megarbane, A., Naman, R. (2001). Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet*. **9(1)**:51-5.

Majeed, H.A., Ghandour, K., Shahin, H.M. (2001). The acute scrotum in Arab children with familial Mediterranean fever. *Pediatr Surg Int*. **16(1–2)**:72– 4.

Majeed, H.A., El-Shanti, H., Al-Khateeb, M.S., Rabaiha, Z.A. (2002) Genotype/phenotype correlations in Arab patients with familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum*. **31**:371–376.

Majeed, H.A., Al-Khateeb, M., El-Shanti, H., Rabaiha, Z.A, Tayeh M, Najib D., (2005). The Spectrum of familial Mediterranean fever Gene Mutations in Arabs: Report of Large Series. *Semin Arthritis Rheum*. **34**:813–818.

McDermot, M.F. (2002). Genetic clues to understanding periodic fevers, and possible therapies. *Trends Mol Med*, **8(12)**:550-554

Medlej-Hashim, M., Rawashdeh, M., Chouery, E., Mansour, I., Delague, V., Lefranc, G., Naman, R., Loiselet, J., Megarbane, A. (2000). Genetic screening of fourteen mutations in Jordanian familial Mediterranean fever patients. *Hum Mutat*, **15(4)**: 384- 390.

Medlej-Hashim M, Delague V, Chouery E, Salem N, Rawashdeh M, Lefranc G, Loiselet J, Megarbane A. (2004). Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAAI and MICA polymorphisms effects. *BMC Medical Genetics* **5**,4

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16(3)**: 1215.

Mijatovic, V., Hompes, P.G.A, Wouters, G.A.J. (2002). Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. Online.

Mimouni A, Magal N, Stoffman N, shohat T, Minasian A, Krasnov M, Halpern JG,

- Rotter IJ, Fischer-Ghondsian N, Danon LY, Shohat M. (2000). Familial Mediterranean Fever: Effect of Genotype and Ethnicity on Inflammatory Attacks and Amyloidosis. *Pediatrics*, **105** (5) p.e 70
- Newton, C.R., Grahan, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Shimit, J.C., Markham, A.F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, **11**: 17(7): 2503-2516.
- Notarnicola, C., Didelot, M.N., Kone-Paut, I., Seguret, F., Demaille, J., Touitou, I. (2002). Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*, **46(10)**: 2785-2793.
- Oberkanins, C., Weinha, A., Kriegsha, G., Moritz, A., Kury, F., Haas, O.A. (2003).Genetic Testing for Familial Mediterranean Fever in Austria by Means of Reverse-Hybridization Teststrips. *Clinical Chemistry*,**49**: 1948-1950
- Ozen, S., Karaaslan, Y., Ozdemir, O., Saatci, U., Bakkaloglu, A., Koroglu, E., Tezcan, S. (1998). Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol*.**25**: 2445–2449.
- Örün, E., Yalçinkaya, F., Özkaya, N., Akar, N., Gökçe, H.(2002). AAA hastalarında akut faz yanıtı ile tümör nekrozis faktör,interlöikin-8 ve interlöikin-6 düzeylerinin değerlendirilmesi. *Ank Univ Tıp Fak Dergisi*.**55(2)**:123-128
- Padeh, S. (2005) Periodic Fever Syndromes. *Pediatr Clin N Am* 52 577– 609
- Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. (2002) SC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*,**293**: 1314-1318
- Papin, S., Duquesnoy, P., Cazeneuve, C., Pantel, J., Coppey-Moisan, M., Dargemont, Amselem, S. (2000). Alternative splicing at the MEFV locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostriin/pyrin protein to the Nucleus. *Hum Mol Genetics*, **9(20)**: 3001-3009
- Patarca, R., Freeman, G.J., Schwartz, J. 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.
- Pras, E., Aksentijevich, I., Gruberg, L., Balow, J.E., Prosen, L., Dean, M., Richards, R.I., Pras, M., Kastner, D.L. (1992). Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Eng J Med*, **326**:1509-513.
- Pras, E., Livneh, A., Balow, Jr. J.E. et al. (1998). Clinical differences between North

- African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am Med Genet.* **75**:216–9.
- Pras, M., (1998). Familial Mediterranean fever: from clinical syndrome to the cloning of the Pyrin gene. *Scand J Rheumatol.* **27**:92– 7.
- Pras, E., Shinar, Y., Shoham, N., Livneh, A., Padeh, S., Langevitz, P., Pras, M. Genotype-Phenotype correlations in Israeli FMF patients.,(2000). *Familial Mediterranean Fever II. Uluslararası Conference*, **3-7** May, Antalya, Turkey, pp: 29-31.
- Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A., Gumucio, D.L. (2001). Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC- induced apoptosis. *J Biol Chem*, **19**: 39320-39329
- Rogers, D.B., Shohat, M., Petersen, G.M., Bickal, J., Schwabe, A.D., Rotter, J.I.(1989). Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet*, **34**: 168-172.
- Rozenbaum, M., Katz, R., Rozner, I. et al. (1992). Decreased interleukin 1 activity released from circulating monocytes of patients with familial Mediterranean fever during in vitro stimulation by lipopolysaccharide. *J Rheumatol*, **19**: 416-418.
- Sachs, D., Langevitz, P., Morag, B. et al. (1987) Polyarteritis nodosa in familial Mediterranean fever. *Br J Rheumatol.* **26(2)**:139– 41.
- Salai, M., Langevitz, P., Blankstein, A. et al. (1993). Total hip replacement in familial Mediterranean fever. *Bull Hosp Jt Dis.* **53**:25 – 8.
- Sayarlioğlu, M., Cefle, A., Inanc, M., Kamalı, S., Dalkılıç, E., Gul, A., Ocal, L., Aral, O. (2004). Characteristics of patients with adult-onset familial Mediterranean fever in Turkey: analysis 401 cases. *Int J Clin Pract*, **59,2**, 202-205
- Shinar, Y., Livneh, A., Villa, Y. et al. (2003). Common mutations in the familial Mediterranean fever gene associate with rapid progression to disability in non-Ashkenazi Jewish multiple sclerosis patients. *Genes Immun* **4(3)**:197 – 203.
- Shohat, M., Shohat, T., Rotter, J.I. (1990). Serum amyloid A and P protein genes in familial Mediterranean fever. *Genomics*, **8**: 83-89.
- Shohat, M., Livneh, A., Zemer, D., Pras, M., Sohar, E. Twin studies in familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*, **44(2)**: 179-182.
- Shohat, M., Magal, N., Shohat, T., Chen, X., Dagan, T., Mimouni, A., Danon, Y., Lotan, R., Ogur, G., Sirin, A., Schlezinger, M., Halperg, G., Schwabe, A., Kastner, D., Rotter, J.I., Fischel Ghodsian N. (1999). Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet*, **7**: 287-292
- Sohar, E., Gafni, J., Pras, M., Heller, H. Familial Mediterranean fever. (1967). A survey

of 470 cases and review of the literature. *Am J Med.* **43**: 227–253.

Stehlik, C., Reed, J.C. (2004). The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation. *J Exp Med* **200(5)**:551–8.

Tekin, M., Yalçinkaya, F., Tümer, N., Akar, N., Mısırlıoğlu, M., Çakar, N. (2000). Clinical, laboratory and molecular characteristics of children with familial Mediterranean fever –associated vasculitis. *Acta Paediatr* **89**: 177-82.

The Fransız FMF Consortium. (1996). The localisation of the familial Mediterranean Fever gene to a 250 kb interval in non-Ashkenazi Jewish founder haplotypes. *Am J Hum Genet*, **59**: 603- 612.

The Fransız FMF Consortium. (1997). Candidate gene for familial Mediterranean fever. *Natur Genet*, **17**: 25-31.

The Uluslararası FMF Consortium. (1997). Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely the cause familial Mediterranean fever. *Cell*, **90**: 797- 807.

Tidow, N., Chen, X., Müller, C., Kawano, S., Gombart, A.F., Fischel-Ghodsian, N., Koeffler, H.P. (2000). Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean Fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*. **95(4)**: 1451-1455.

Tunca, M., Tankurt, E., Akbaylar-Akpinar, H. et al. (1997). The efficacy of interferon alpha on colchicine-resistant familial Mediterranean fever attacks: a pilot study. *Br J Rheumatol* **36(9)**:1005– 8.

Tunca, M., Akar, S., Hawkins, P.N., Booth, S.E., Sengul, B., Yavuzsen, T.U., Oktem, S., Soyuturk, M., Akkoc, N., Booth, D.R. (2002). The significance of paired MEFV mutations in individuals without symptoms of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet*. **10**:786–789.

Turkish FMF Study Group. (2005). Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine* **84**:1–11

Touitou I. (2001). The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet*, **9**: 473-483.

Touitou I. (2003). Standardized Testing for Mutations in FMF. *Clinical Chemistry* **49**:11

Yalçinkaya, F., Çakar, N., Mısırlıoğlu, M., Tümer, N., Akar, N., Tekin, M., Taştan, H., Koçak, H., Özkaya, N., Elhan, A.H. (2000). Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation independent amyloidosis. *Rheumatology*, **39**: 67-72.

Yilmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Duzova, A., Topaloglu, R., Besbas, N., Saatci, U., Bakkaloglu, A., Ozguc, M. (2001). Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet*, **9**:553–555.

Yuval, Y., Hemo-Zisser, M., Zemer, D., Sohar, E., Pras, M. (1995) Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*, **57** :455-57

Zemer, D., Revach, M., Pras, M. et al. (1974). A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* **291**:932– 44.

<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>

<http://www.orphanet/data/patho/GB/uk-fmf.pdf>

<http://www.viennalab.com>

VIII. EKLER

Ek.1

Tarih:

HASTA OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Polikliniklerinde AAA tanısı konan hastalardan 5ml EDTA'lı kan örneği alınarak DNA analizi yapılacaktır. Araştırmaya katılmak tamamen hastanın kendi rızası ile olacaktır ve hiçbir yükümlülük getirmeyecektir.

Gönüllüye, araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda bahsedilen araştırma ve diğer genetik testlerin yapılmasını kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Tel:

Velayet ve vesalet altında bulunanlar için veli veya vasiinin

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Tel:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Tel:

Rıza alma işlemine tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı Soyadı:

İmzası:

Ek.2

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTA BİLGİ FORMU

Hastanın Adı, Soyadı	
Dosya No:	
Mesleği	
Adres	
Tel	
Yaşı ve cinsiyeti	
Doğum yeri ve yılı	
Sevk edildiği departman	
Klinik Tanı (FMF için)	<input type="checkbox"/> Ateş <input type="checkbox"/> Atak sıklığı () <input type="checkbox"/> İlk semptom yaşı <input type="checkbox"/> Karın ağrısı <input type="checkbox"/> Atak süresi () <input type="checkbox"/> İlk teşhis yaşı <input type="checkbox"/> Göğüs ağrısı <input type="checkbox"/> Amiloidoz <input type="checkbox"/> Kolşisin kullanımı <input type="checkbox"/> Eklem ağrısı <input type="checkbox"/> Apandisit ameliyatı <input type="checkbox"/> Kolşisine cevap <input type="checkbox"/> Eritem <input type="checkbox"/> Ağızda aft/lezyon <input type="checkbox"/> Lenfadenopati
Hastalığın aileselliği	
Ailesinde ve Kendisinde (AK) Kanser hikayesi	
AK Diabet hikayesi	
AK Hipertansiyon hikayesi	
AK Behçet hikayesi	
AK Koroner arter hikayesi	
AK Böbrek taşı hikayesi	
AK Periodontitis hikayesi	
AK Prostat CA hikayesi	
AK Şizofreni hikayesi	
AK Mesane CA hikayesi	
AK Meme CA hikayesi	
AK Kistik fibrosis hikayesi	
AK Psöriasis hikayesi	
Sigara kullanımı(paket/gün)	
Pedigri	

IX. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Serbülent YİĞİT

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 12.08.1975

Medeni Durumu: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

E-Mail: syigit@omu.edu.tr

Eğitim Durumu: 1982-1987 Cumhuriyet İlkokulu

1987-1990 Cumhuriyet Ortaokulu

1990-1993 Bafra Lisesi

1994-1999 AÜ Veteriner Fakültesi

Görev Yeri: OMU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Doktora: 2000 OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Doktora Tez Konusu: Bölgemizdeki Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF)

Hastalarında Mutasyon Noktalarının ARMS, RFLP VE STRİP

Yöntemiyle Taranması