

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FMF) HASTALARINDA VE AİLE
BİREYLERİNDE MEFV GEN MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

ÖZKAN ÖZTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. İLHAMİ GÖK

HAZİRAN – 2013

KARS

Bu tez çalışması MMF-61 numaralı proje ile KAÜ/BAP tarafından desteklenmiştir.

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FMF) HASTALARINDA VE AİLE
BİREYLERİNDE MEFV GEN MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

ÖZKAN ÖZTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ


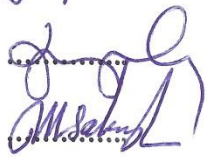

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. İLHAMİ GÖK

HAZİRAN – 2013

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Özkan ÖZTAŞ'ın Yrd. Doç. Dr. İlhami GÖK'ün danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “ Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalarında ve Aile Bireylerinde MEFV Gen Mutasyonlarının İncelenmesi ” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği* ile kabul edilmiştir.

18.10.2013

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan:	Yrd. Doç. Dr. İlhami GÖK	
Üye :	Doç. Dr. M. Ali KIRPIK	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/....../2013 gün ve/
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Genetik Hastalıklar	3
2.1.1 Multifaktöryel kalıtımla geçen hastalıklar:	3
2.1.2 Kromozom hastalıkları:	4
2.1.3 Tek gen hastalıkları:	4
2.2 Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) ya da Familial Mediterranean Fever (FMF)	4
2.2.1 Tarihçe.....	5
2.2.2 Hastalığın Klinik Özellikleri.....	5
2.2.3 Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetiği.....	9
2.2.4 Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	13
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1 Hasta Grubu Bireylerin Seçimi	16
3.2 Hastalar ve Demografi:	17
3.3 Kontrol Grubu Bireylerinin Seçimi:	18
3.4 Kullanılan Kimyasallar	18
3.5 Kullanılan Araç ve Gereçler	18
3.6 Kullanılan Solüsyonlar	19
3.7 Periferik Kanda DNA İzolasyonu	20
3.8 DNA Konsantrasyonunun Nanodrop Spektrofotometrede Ölçümü.....	21
3.9 FMF’li Hastalarda ve Kontrol Gruplarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Mutasyon Analizi.....	21
3.10 Agaroz Jel Elektroforezi	23

3.11 İstatistik Analizi	24
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	40

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan Hatay ilimizde yaşayan farklı ailelerin M694V ve E148Q gen mutasyonlarının yaygınlığı belirlemek amacıyla yapıldı.

Tez çalışmamda büyük emeği geçen, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak bilimsel katkı ve önerileri ile yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olanakları en iyi şekilde kullanmamı sağlayan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İlhami GÖK'e, klinik tanılarının konulması ve örneklerin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ÇELİK'e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları esnasında katkılarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e ve Sayın Arş. Gör. Sevcan MERCAN'a, yüksek lisans öğrencisi İlknur ÇELEBİ, Vasfiye ESEN'e ve Meryem BADAY, tez yazımında yardımcı olan Neşet TİMUR, Mirza ÖZBEG ve diğer ev arkadaşlarıma, yüksek lisans eğitimim boyunca gerek maddi gerekse manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve değerli nişanlım Hemşire Sinem KART'a ve daha ismini yazamadığım bütün arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Kars-2013

ÖZKAN ÖZTAŞ

ÖZET

Bu çalışma Hatay ilimizde yaşayan farklı ailelerden M694V ve E148Q gen mutasyonlarının yaygınlığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Araştırmamızda kliniklerde Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığı ön tanısı alan, 19 aileden toplam 78 birey ve 100 kişilik kontrol grubu incelendi.

Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığına bağlı mutasyonlardan Ekson 2'de M694V ile Ekson 10'da E148Q mutasyon tiplerinin yaygınlığı incelendi. Klinik olarak her aileden en az bir FMF ön tanısı konulan bütün aile bireylerinden tam kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilmiş DNA örnekleri mutasyon gen primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) amplifiye edildi. Daha sonra PCR ürünleri agaroz Jel Elektroforezi yürütülerek FMF ile ilişkili nokta mutasyonlarının bu gruplardaki sıklığı jel resimleri yardımıyla belirlendi.

Sonuç olarak 19 aileden toplam 78 kişinin hepsinde M694V mutasyonu (%100) görüldü. Çalışılan 100 kişilik kontrol grubunda ise 26 (%26) kişide M694V mutasyonu gözlemlendi. Bu bulgular hastalığın otozomal resesif geçişli olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca incelenen tüm aile bireylerinde E148Q mutasyonu 28 (%35.89) kişide kontrollerde ise bu mutasyon 8 (%8) kişide görüldü. Araştırmamızda E148Q mutasyonu Türkiye için yapılan ilk çalışma olduğu için ülkemiz FMF klinik tanılarında önemli katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), MEFV geni, Doğu Akdeniz, PCR, Mutasyon

ABSTRACT

This research was made to estimate frequency of mutation of M694V and E148Q gene from different families in Hatay.

A total of 78 members from 19 different families, who have the FMF disease diagnosed in clinics, and a control group consist of 100 members were examined in this research.

The frequencies of mutations belong to FMF, M694V were examined from Exon 2 and E148Q were examined in exon 10. The member who has clinically diagnosed with FMF gene had attracted our intention to take blood examples from whole family members. The DNA isolation was carried out from family member's blood examples. Polymerase chain reaction procedure was applied to isolated DNA examples by using primer pairs in order to identify mutations. The jel electrophoresis procedure was used to visualize the presence of point mutations in FMF and control group.

The result revealed that M694V mutations were seen in all the 78 members of 19 different families. Among 100 members of control group, 26 (%26) had M694V. This rate of diagnoses confirm the autosomal ressesif transition. Besides that E148Q mutation was seen in 28 (%35.89) members of FMF and 8 (%8) members of control group. To the extend of our knowledge, this is the first study target E148Q mutation for FMF gene in Turkey, so this research assumed to have crucial importance in clinics to diagnose FMF gene.

Key words: Familial Mediterranean Fever (FMF), MEFV Gene, East Mediterranean, PCR, Mutation.

KISALTMALAR

FMF	Familial Mediterranean Fever
AA	Amiloid A
AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
MEFV	Mediterranean Fever
PAN	Poliarteritis Nodosa
HSP	Henoch-Schönlein Purpurası
NSAİ	Non-steroid antiinflamatuar
SAA	Serum Amiloid A
ELE	Erizipel benzeri eritem
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EtBr	Etidyum Bromid
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RE	Restriksiyon Endonükleaz
TAE	Tris asetik asit-EDTA
TBE	Tris borik asit-EDTA
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
E	Glutamik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1: FMF hastalığında görülen belirti ve bulgular.

Şekil 2.2.3.1: MEFV Geni ve şematik olarak gösterimi

Şekil 2.2.3.2: MEFV genindeki bilinen ya da bugüne kadar tanımlanmış olan mutasyonlar.

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1: M694V mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.2: M694V mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.3: E148Q mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.4: E148Q mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.5: Kontrol Grubu M694V mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.6: Kontrol Grubu M694V mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.7: Kontrol Grubu E148Q mutasyonunun jel resimleri

Resim 4.8: Kontrol Grubu E148Q mutasyonunun jel resimleri

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.3.1. MEFV Geni Genel Yapısı

Çizelge 3.2.1. Hastaların cinsiyet ve yaşlara göre dağılımı

Çizelge 3.2.2. Hastaların klinik özellikleri

Çizelge 3.9.1. M694V ile E148Q mutasyonları için optimum çoğalmanın gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı.

Çizelge 3.9.2. M694V PCR yöntemi için kullanılan primer dizileri

Çizelge 3.9.3. E148Q PCR yöntemi için kullanılan primer dizileri

Çizelge 4.3. M694V mutasyonunun hasta kontrol grubuna göre dağılımı

Çizelge 4.4. E148Q mutasyonunun hasta kontrol grubuna göre dağılımı

Çizelge 3.9.4. M694V ve E148Q mutasyonları için uygun PCR programı

Çizelge 4.1. MEFV Gen mutasyonlarının dağılımı

Çizelge 4.2. Mutasyonların cinsiyetlere göre dağılımı

Çizelge 5.1. M69V ile E148Q mutasyonları üzerinde yapılan bazı çalışmaların sonuçları

1. GİRİŞ

Genetik hastalıklar, ebeveynlerin gelecek nesillere genlerle aktardıkları hastalıklardır. Genetik hastalıklar son zamanlardaki genetik bilimindeki gelişmeler sayesinde daha rahat tespit edilmekte ve gerektiğinde genlerden bu hastalıklar ayıklanmaktadır[1]. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA veya FMF MİM 249100); Akdeniz çevresinde yaşayan toplumlarda sık görülen, tekrarlayan, kendi kendini sınırlayan, ateş ile birlikte karın ağrısı, plörit, artrit, erizipel benzeri deri lezyonları ve zamanla amiloidoz gelişimi ile karakterize otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar hastalıktır [2-3].

AAA (Akdeniz Ateşi) birçok etnik grupta görülmekle beraber; Türkler, Ermeniler, Araplar ve Yahudilerde sıktır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar taşıyıcılık sıklığının Ermenilerde 1/7, Sefarad Yahudilerde 1/8-1/16 olduğunu ortaya koymuştur. Aynı gruplarda AAA prevalansı 1/250-1/1000 arasında değişmektedir [2,3]. Türk AAA çalışma grubunun sonuçlarına göre hastalığın görülme sıklığı 1/1000, taşıyıcılık oranı ise 1/5 gibi yüksek değerlerdedir [4].

Hastalığın otozomal resesif geçişli olduğu bildirildikten sonra, 1992 yılında hastalıktan sorumlu genin 16. kromozomun kısa kolunda olduğu gösterilmiştir [5]. 1997 yılında iki uluslararası grup birbirinden bağımsız olarak aynı zamanda MEFV (Mediterranean FeVer) geni adını verdikleri AAA genini klonlamışlardır [6-7]. İlk olarak 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından “uygun olmayan bir paroksimal sendrom” başlıklı makalede tanımlanmıştır. 1945 yılında Allerjist Dr. Sheppard Siegal 5 olguyu “Dişleri tutan destek kemiğe yakın olan tümör” adı altında yayınlamıştır. 1946 yılından Marmaralı Abrevaya “Garip bir karın sendromu”, Türk Tıp Cemy Mecm. 1954 yılında Hobart Reimann Lübnan’dan çoğu Ermeni 72 vaka bildirmiştir. 1958 yılında Prof. Heller hastalığa “Familial Mediterranean Fever” ismini vermiştir. 1959 yılında Sökmen C. Trans Association American Physiology dergisindeki yorumunda ülkemizde Ermeni kökenli olmayan çok sayıda FMF olgusundan bahsetmiştir. 1967 yılında Sohar Etal 470 vakalık bir seri yayınlamıştır. 1972 yılında Goldfinger Kolşisin kullanımı öne sürmüştür.

DNA tabanlı polimorfizm çeşitliliği ve mutasyon araştırmaları polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile yapılabilmektedir. Bu araştırma Türkiye'nin Doğu Akdeniz Bölgesindeki Hatay ilinden alınan AAA'li ailelerin hasta ve taşıyıcı bireylerindeki MEFV geninde bulunan M694V ve E148Q mutasyonları çalışılması planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında moleküler tanısı için kullanılacak metodlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayalı metot ile mutasyon analizlerini içermektedir. Araştırmamız çalışma için etik kurul izninin alınması, Hatay bölgesinde belirlemiş olduğumuz 78 bireyden kan örneklerinin toplanması, numunelerden DNA izolasyonu ve moleküler temelli analizleri içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Genetik Hastalıklar

İnsan genomunda yaklaşık 20.000 gen olduğu tahmin edilmiştir [8]. Bundan 15 yıl öncesine kadar olan tahminlerde bu sayı 100.000 dolayında iken, dizi kalitesi ve gen bulma yöntemleri geliştikçe gen sayısı aşağıya çekilmiştir [9]. Genetik hastalıklar çoğunlukla çok ciddi sorunlara yol açan ancak tedavi olanakları şimdiki durumda sınırlı olan hastalıklardır. Ayrıca aile bireylerinden bir kişide bu hastalıkların ortaya çıkması, ailenin diğer fertleri için risk meydana getirebilir. Genetik hastalıkların teşhisleri için gerek yetişmiş insan gücü, gerek teknolojinin son imkânları ile donatılmış laboratuvarlara ihtiyaç olduğu için bu hastalıkların büyük çoğunluğu ne yazık ki teşhis edilememektedir. Genetik hastalıklar nadir olmayan fakat oldukça sık görülebilen hastalıklardır [8].

Bu hastalıkları genel olarak üç büyük grupta toplamak mümkündür;

- * Multifaktöryel kalıtımla geçen hastalıklar
- * Kromozom hastalıkları
- * Tek gen hastalıkları

2.1.1 Multifaktöryel kalıtımla geçen hastalıklar:

Hemen bütün doğumsal anomaliler bu şekilde kalıtılır. Bunlar doğuştan kolaylıkla fark edilebilen veya ilk bakışta tanımlanamayan ancak özel muayene ve tetkiklerle ortaya çıkarılabilen sakatlıklar olabilir. Fazla parmak gibi oldukça zararsız olabileceği gibi hayatı ciddi şekilde tehdit eden ağır sakatlıklar şeklinde de görülebilir. Multifaktöryel kalıtımla geçen hastalıkların aile bireylerinde görülme olasılığı 1. derece akrabalar (anne, baba ve kardeş) arasında yaklaşık % 2-10 'dur. Bu sıklık genel toplumda görülme olasılığına göre 20-40 kat fazladır [9].

2.1.2 Kromozom hastalıkları:

İnsanların normalde 23 çift olarak düzenlenmiş 46 kromozomları vardır. Bunlardan ilk 22 çifti cinsiyet dışında kalan özellikleri belirlerler. Son çift X ve Y kromozomları olarak adlandırılır ve cinsiyeti belirler [8]. Kromozomlar genetik bilginin taşıyıcılarıdır. Kromozom hastalıkları insanlarda bulunan 46 kromozomun sayı ve şekil olarak normalden farklı olması sonucu ortaya çıkar. Sık görülen hastalıklardır (1/700 - 1/1000). Ağır gelişme ve zekâ geriliğine neden olurlar. Hasta çocuklarda bu zekâ ve gelişme geriliğine ek olarak çeşitli organları ilgilendiren doğuştan sakatlıklar vardır.

2.1.3 Tek gen hastalıkları:

Bu hastalıklar insanda var olduğu tahmin edilen 35.000 kadar genden herhangi birinin değişikliğe uğraması sonucu ortaya çıkar. Kalıtım şekli farklı olmakla birlikte bu hastalıklar ailede yüksek oranda tekrarlama riskine sahiptir. Hastalığa sebep olan gen sayısı çok fazla olduğundan bulgular da çok değişik olabilir. Hastalık zekâ geriliği, doğuştan sakatlık, kan hastalığı, kas hastalığı, görme bozukluğu, cilt hastalığı, böbrek hastalığı, kalp hastalığı, ishal, zatürre gibi çok değişik bulgularla karşımıza çıkabilir [9].

2.2 Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) ya da Familial Mediterranean Fever (FMF)

Ailevi Akdeniz Ateşi otozomal resesif kalıtmı, akut, kendini sınırlayan ateş atakları ile karakterize, inflamatuvar bir hastalıktır. Bu ataklara genellikle steril bir peritonit, plörit, mono veya oligo-artiküler artrit ve/veya deri döküntüleri eşlik eder [10]. FMF hastalarının yaklaşık %90'ında klinik bulgular 20 yaşından önce ortaya çıkar [11]. Hastalığın başlangıç yaşı ortalama 4'tür ve bu özelliği nedeniyle aslında bir çocukluk çağı hastalığıdır [12].

2.2.1 Tarihçe

AAA ile ilgili ilk olgu sunumu 1908 yılında T.C. Janeway ve H. O. Mosenthal tarafından Yahudi bir genç kızda süt çocukluğu döneminden beri var olan, ayda bir yineleyen, karın ve göğüs ağrısı ile birlikte 40 °C'ye varan ateş ile seyreden bir hastalıktır. Bu olguda ataklar ile birlikte lökositoz varlığı da rapor edilmiştir [13]. İlk olgudan sonra 1945 yılında Amerikalı araştırmacı Siegal, "Benign Paroksizmal Peritonitis" adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları ile seyreden bir klinik antite tanımlamıştır [14]. 1948 yılında Reiman " Periyodik hastalık" tanımlamasını kullanmıştır [15]. 1951 yılında ilk kez Catton ve Mamou hastalığın ailevi olduğuna dikkat çekmişler ve 1956 yılında aynı bilim adamları AAA' lı hastalarda amiloid gelişebileceğini bildirmişlerdir [16]. Heller ve Sohar 1958 yılında ilk kez "Ailevi Akdeniz Ateşi" tanımını kullanmışlar ve 1961 yılında aynı bilim insanları hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir [17]. Türkiye'de ise ilk FMF hastası "Garip Bir Karın Ağrısı Sendromu" adı ile 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından bir erişkinde tanımlanmıştır [18].

Kolşisinin AAA tedavisinde kullanılabileceği ilk kez 1972 yılında yayınlanmıştır [19,20].

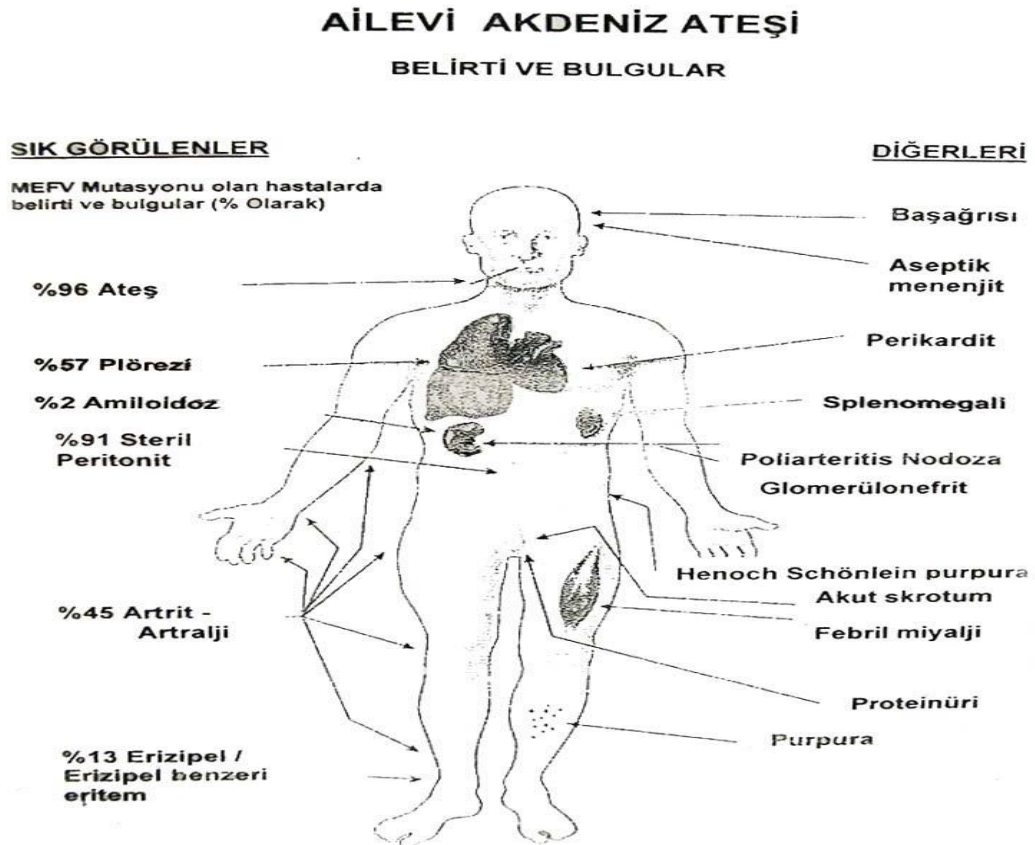
1992 yılında AAA'dan sorumlu genin 16. kromozom kısa kolunda olduğunun anlaşılması ve 1997 de MEFV geninin klonlanması, hastalığın etiyopatogenezini anlamamızda önemli bir adım olmuştur [4,5,6].

2.2.2 Hastalığın Klinik Özellikleri

Hastalık ateşli, ağrılı ataklarla karakterize olup 38,5-40 C° arasındaki yüksek ateşe, periton, plevra ya da sinovyum seröz membranlarından birinde oluşan inflamasyonun neden olduğu ciddi karın, göğüs veya alt ekstremitenin geniş eklemlerinden birinin ağrısı eşlik eder. Hastalar genellikle atakları başlatan bir etken tarif etmezler ancak FMF ataklarının bazı hastalarda menstruasyon, duygusal stres veya ağır fiziksel aktivite dönemlerine rastladığı görülür. Bazı hastalarda ise titreme benzeri şikâyetler de görülmektedir [21].

Ataklar kısa süreli olup 1-3 gün sürer ve tedavi edilmeden kendiliğinden iyileşir. Ancak atağa eşlik edebilen artrit veya artralji daha uzun sürebilmektedir. Ortaya çıkan ateşin yüksekliği ya da tutulan inflamasyon bölgesi bir ataktan diğerine farklılık gösterebilir. Atakların seyri hastalar arasında çeşitlilik gösterebileceği gibi aynı ailenin bireylerinde bile farklı atak seyirleri görülebilmektedir. Ömür boyu süren bu hastalığın seyrinde bir hastanın, hastalığın çok çeşitli fomları ile karşılaşması mümkündür ancak sıklıkla aynı hastada yıllar boyunca aynı tip atak görülür [11].

Hastalığın erkek ve kadınlarda görülme oranı: erkekler lehine olup 1,2:1'dir. Bunun nedeninin hastalık fenotipinin kadınlardaki eksik penetransı ya da MEFV'nin iki alelinde de mutasyon taşıyan dişi zigotlardaki artmış embriyonik ölümden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [21,22].



Şekil 2.2.1: FMF hastalığında görülen belirti ve bulgular [23].

2.2.2.1 Ateş

Ateş her atak sırasında görülen ve tanı için gerekli kabul edilen bir bulgudur. Çok nadir olmakla birlikte bazı vakalarda ateş olmayabilir [11,23,24]. Atak sırasında hastanın ateşi 38-40 °C arasında değişebilir. Ateş atak boyunca devam eder ve ortalama 12-72 saat kadar sürebilir. Genelde ateşe diğer bulgular eşlik eder, fakat nadir de olsa yalnız ateşle seyreden olgularda tarif edilmiştir. Kolşisin alan hastalarda ataklar sırasında ateş görülmeyebilir [3,11,23,24]. 40 °C'ye varan, ağrı ya da başka lokalize inflamasyon bulgularının eşlik etmediği kısa süreli izole ateş yükselmeleri özellikle çocuk hastalarda görülüp birkaç saat sürer. FMF'in bu fenomeni çoğu zaman yanlılıkla viral farenjite veya tonsillite bağlanır [11]. Bazı ataklarda ateş tek bulgu olarak karşımıza çıkabilmektedir.

2.2.2.2 Karın Ağrısı

FMF tanısı ile izlenen hastaların %91'inde peritoneal inflamasyona bağlı olarak karın ağrısı görülür. Ateşten sonra en sık görülen bulgudur [3,23,25].

2.2.2.3 Göğüs Ağrısı

Plörit unilateral ve bilateral göğüs ağrısına neden olup hastaların % 25-50'sinde görülür. Semptomlar 24-72 saat sürer ve sıklıkla tek taraflıdır [27]. Bu tek taraflı febril plöritde tıpkı peritoneal ataklar gibi ani başlangıçlı ve önceden belirlenemeyen tekrarlarla seyrettiğinden akut bir tablo zannedilebilir. Nefes alıp verirken ağrı olur ve etkilenen tarafta solunum sesleri azalır. Kostofrenik sinüsteki az miktardaki eksuda radyolojik olarak gösterilebilir. Bu eksuda çok sayıda nötrofil içerip 48 saat içinde geriler [26].

2.2.2.4 Eklem Ağrısı

Eklem atakları, FMF'in önemli bir özelliğidir ve sık (%75) görülür. Ataklar küçük travmalar veya uzun süreli egzersizlerle tetiklenebilir. FMF'de görülen klasik eklem tutulumu akut monoartrit şeklinde olup genellikle alt ekstremitelerin büyük eklemleri

(ayak bileği, diz, kalça) tutulur. Ateş eşlik eder, birkaç gün, en fazla bir ay sürer ve kendiliğinden düzelir. Hastalardan alınan sinovyal sıvı örneği bulanık, viskozitesi azalmış ve nötrofillerce zengindir. Gram boyama ve kültür sonuçları negatiftir [28,29].

2.2.2.5 Cilt Bulguları

Cilt ile ilgili bulguların sıklığı çeşitli yayınlarda %12 ile %43 arasında saptanmıştır (30,31). Bunlar içinde en sık görüleni olan erizipel benzeri eritem FMF’li çocukların %11’inde görülür. Sıcak, ağrılı ve şiş olup 10 ile 35cm²’lik bir alanı kaplar. Çoğunlukla alt ekstremitede ayak bileği ile diz arasında ayak sırtında bulunurlar [4,21].

2.2.2.6 Vasculit

Henoch Schönlein Purpurası (HSP), Poliarteritis Nodosa (PAN) gibi vaskülitlerin FMF’li hastalarda ortaya çıkma oranının genel popülasyona göre daha sık olduğu saptanmıştır [32,33].

2.2.2.7 Kas Ağrısı

FMF hastalarının % 20 kadarında miyalji vardır. Kas ağrısı iki farklı şekilde ortaya çıkabilir. Hafif olan tipinde kas ağrısı genellikle iki gün sürer ve genelde akşamları ortaya çıkar; etkilenen hastalar fiziksel aktivite ile artan alt ekstremitte ağrılarından yakınır ve bu ağrıları genellikle NSAİ ilaçlara cevap verir. Nadir vakalarda hastalarda inatçı “febril miyalji” ortaya çıkar. Bu vakalarda ateş bir ay kadar sürebilir ve buna kas ağrısı, artrit, diyare ve purpura eşlik edebilir [34].

2.2.2.8 AA (Amiloid A) Amiloidoz

Amiloidoz, çeşitli organlarda fibriler proteinlerin depolanması ile karakterize bir protein metabolizması hastalığıdır. Sistemik amiloidozun etyolojisi multifaktöriyel olup primer ve sekonder (reaktif) tipleri tanımlanmıştır [11]. FMF ve AA Amiloidoz hastalığının en önemli komplikasyonu sistemik progresif AA amiloidoz gelişimidir. Amiloidoz, FMF’li hastalarda sık görülen bir durum olup, FMF’in amiloid A (AA) protein

depolanmasından kaynaklanan en ciddi komplikasyonudur. Bu AA tipi bir amiloidozdur ve son dönem böbrek yetmezliğine neden olan progresif nefropati olarak ortaya çıkar. FMF ile ilgili amiloidoz klinikte en sık nefrotik sendrom ile karşımıza gelir. Bu hastalar çoğunlukla normotansif ve nonhematüriktir [11]. Bunun dışında kalp, böbrek üstü bezleri, karaciğer, tiroid ve ince bağırsaklarda da amiloidoza rastlanabilir [11]. AA proteininin karaciğerde yapılan bir akut faz reaktanı olan SAA bir yıkım ürünü olduğu tahmin edilmektedir. SAA'nın uzun süre plazmada yüksek konsantrasyonda bulunması sonucu yıkım ürünü olan AA proteini dokularda birikebilir. Ancak SAA'nın artmış konsantrasyonu amiloidoz gelişimini açıklamak için yeterli değildir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar amiloidogenezin genetik alt yapısını açıklama konusunda SAA polimorfizmi üzerine odaklanmıştır [25].

2.2.3 Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığının Genetiği

Klasik olarak, otozomal resesif şekilde kalıtılmaktadır. Fakat nadirde olsa otozomal dominant kalıtım bildirilmiştir. 1992 yılında tanımlanan hastalıktan sorumlu gen iki farklı çalışma grubu tarafından (Uluslararası AAA konsorsiyumu ve Fransız AAA konsorsiyumu) tarafından klonlanmış ve MEFV geni olarak isimlendirilmiş ve 1997 yılında yayınlanmıştır.

MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olan 10 eksonluk orta büyüklükte (yaklaşık 10 kilobazlık) bir gen olup 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır [5, 35]. Bu proteine uluslararası konsorsium grubu ateş anlamına gelen pyrin, Fransız grup ise Latince bizim Akdeniz anlamına gelen “mare nostrum” kelimelerinden oluşan marenostriin adını vermişlerdir. Her iki isimde halen günümüzde kullanılmaktadır.

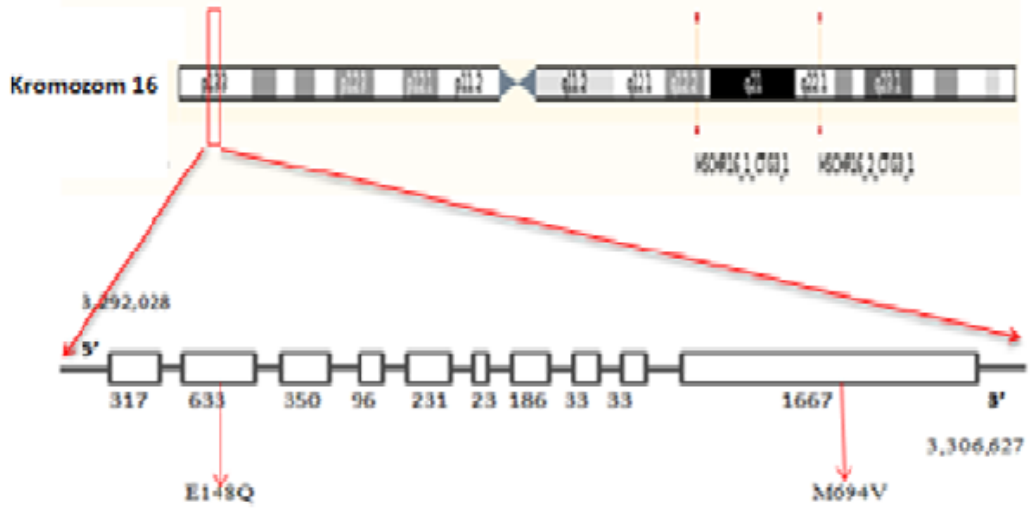
Çizelge 2.2.3.1: MEFV Geni Genel Yapısı [6].

Protein:	Pyrin/Marenostrin	Uzunluk
Transkript Pozisyonu:	chr 16: 3292313-3306912	14.600 bç
DNA dizi Analizi Pozisyonu:	hr 16: 3293426-3306872	13.447 bç

Ekson/İntron Numarası	Pozisyon	Uzunluk bç
Ekson 1	3306914-3306596	317
İntron 1	3306597-3305076	1522
Ekson 2	3305077-3304443	633
İntron 2	3304444-3300066	4379
Ekson 3	3300067-3299716	350
İntron 3	3299717-3299290	428
Ekson 4	3299291-3299194	96
İntron 4	3299195-3297532	1664
Ekson 5	3297533-3297301	231
İntron 5	3297302-3296833	470
Ekson 6	3296834-3296810	23
İntron 6	3296811-3294874	1938
Ekson 7	3294875-3294758	116
İntron 7	3294759-3294572	188
Ekson 8	3294573-3294539	33
İntron 8	3294540-3294178	363
Ekson 9	3294179-3294148	30
Intron 9	3294149-3293983	167
Ekson 10	3293984-3292313	1670

Eksonlar Toplamı mRNA	3499
------------------------------	------

MEFV GENİ



Şekil 2.2.3.1: MEFV Geni ve şematik olarak gösterimi [6].

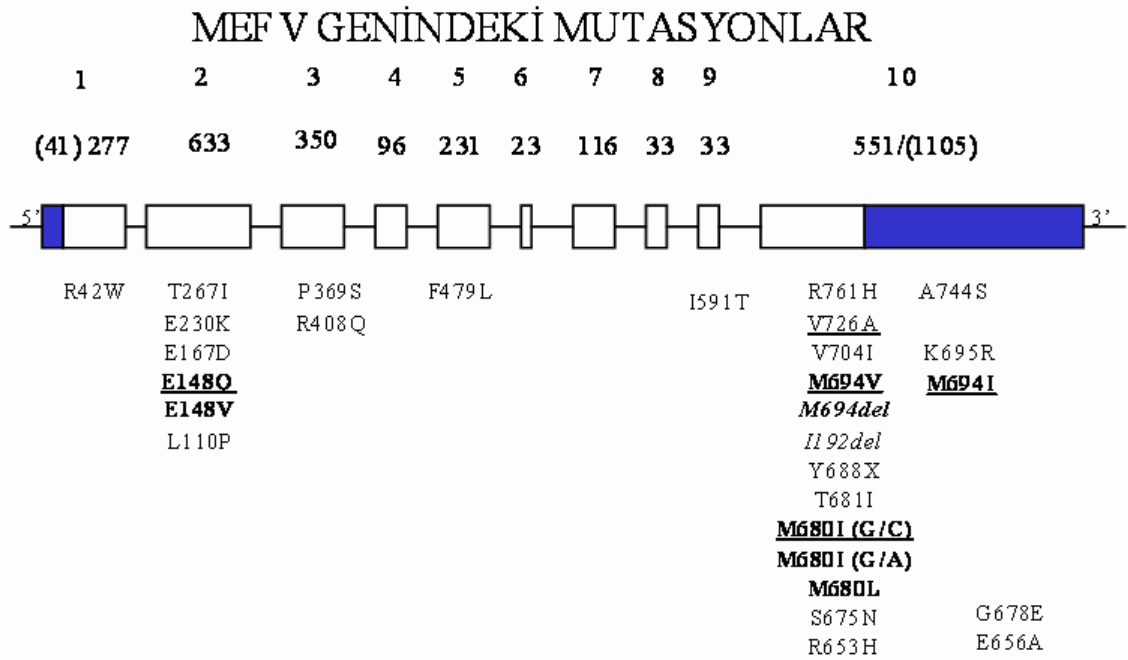
MEFV geni başlıca granüositlerde, sitokin tarafından aktive edilen monositlerde, serozal ve sinovyal fibroblastlarda eksprese edilir [38]. MEFV üzerinde 140 mutasyon tanımlanmıştır. Bir anlamsız (nonsense) mutasyon [36], üç delesyon ve iki insersiyon dışında tüm mutasyonlar yanlış anlamlı mutasyonlardır [37]. Ucuna yakın (Ekzon 10) kümelenmişlerdir. Fransız FMF konsorsiyumu (1997) 10. ekzondaki 4 missense mutasyonun (M694V, M680I, V726A ve M694I) hasta mutasyonların çoğu 3 grubunun %85'ini oluşturduğunu bildirmişlerdir.

2.2.3.1 MEFV Geninde Mutasyonların Dağılımı

FMF geni (MEFV) lokalizasyonunun tam olarak belirlenmesi ve klonlanmasından sonra, 1997 yılından itibaren hastalıkla ilgili mutasyonlar tanımlanmaya başlanmıştır. Mutasyon analizlerinde; klonlanan cDNA (Komplementer deoksiribonükleik asit)'da dört yanlış anlamlı mutasyon “Met680Ile; Met694Val; Val726Ala; Met694Ile” tanımlanmıştır [6]. 1998’de bu dört mutasyona ek olarak, 10. ekzonda dört yeni nadir mutasyon (692’de delesyon, Lys695Arg, Ala744Ser, Arg761His); 5.ekzonda bir Phe479Leu” ve 2.ekzonda ise üç mutasyon daha (Glu148Gln, Glu167Asp, Thr267Ile)

bildirilmiştir [40]. Günümüzde ise bu gende 76'dan fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır [39].

Mutasyonlar MEFV geninin 1., 2., 3., 5., 9. ve 10. ekzonunda bulunmaktadır (Şekil 2.2.3.2). MEFV geninin 10. ekzonu mutasyonlar için hassas bir bölgedir. 10.eksondaki M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları ve 2. Ekzondaki E148Q mutasyonu taşıyıcı ya da hasta kromozomlardaki FMF mutasyonlarının %85'ini oluşturur [41,40,43,44]. FMF'de en sık görülen 4 mutasyon (missense mutasyon) pirin proteininin karboksi terminal bölgesinde bulunmuştur. FMF vakalarının büyük çoğunluğundan, hangi etnik kökenden olursa olsun, bu mutasyonların sorumlu olduğu tespit edilmiştir [45].



Şekil 2.2.3.2: MEFV genindeki bilinen ya da bugüne kadar tanımlanmış olan mutasyonlar. En sık görülen 5 mutasyon, E148Q, V726A, M694V, M694I ve M680I (G/C)'dir. Rekombinasyon 3 mutasyon E148V, M680I (G/A) ve M680L'dir. Delesyonlar, I192del ve M694del'dir. Bu mutasyonlar arasında Y688X nonsensedir [42].

2.2.3.2 MEFV geni mutasyonları fenotip-genotip ilişkisi

MEFV geninde rastlanan mutasyonların büyük bir kısmı nükleotid yer değiştirmesi şekli ile olup genellikle 10. ekzondadır [42]. Pürinin B30.2 domaininde konservatif aminoasit substitisyonlarına neden olmaktadır. M644V ve M694I ilk belirlenen mutasyonlardır. M680I ve V726A daha sonra belirlenen mutasyonlardır.

Özellikle homozigot olmak üzere M694V mutasyonunu taşıyan Kuzey Afrikalı Yahudilerde %90 olguda mutasyonla amiloidoz gelişmesi arasında sıkı bir ilişki gösterilmiştir [19]. Bazı çalışmalarda M694V mutasyonu ile ağır bir fenotip bildirilmesine rağmen başka diğer çalışmalar tarafından ise reddedilmiştir [47]. Ayrıca amiloidozun M694V'den başka mutasyon varlığında amiloidoz riskinin azaldığı bildirilmiştir [48,49,50].

2.2.4 Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Canlılarda bulunan özgün genetik parçacıkların (DNA veya RNA) enzimatik olarak invitro olarak çoğaltılmasıdır. Kullanılan enzim “polimeraz” enzimidir. Aslında PCR işleminin (DNA polimerizasyonu-DNA'nın kopyalanarak çoğaltılması) canlı hücrelerde devamlı olmaktadır. PCR DNA polimerizasyon işleminin belli özel amaçlar için minik deney tüplerinde (PCR tüpleri) veya cam borucuklarda yapılan bir kopyasıdır. Canlı hücreler içindeki polimerizasyon işleminin, PCR tüpleri içinde, gerekli tüm kimyasal maddeler konularak ve sıcaklık parametreleri uygulanarak taklit edilmektedir [52].

PCR Çeşitleri

- **Klasik PCR:** Hedef DNA dizisinin her iki ucuna spesifik primerler kullanarak termostabik DNA polimeraz yardımıyla uygulanan DNA çeşididir. Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir [52].
- **Multipleks PCR:** Klasik veya Real Time PCR' in modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır. Multipleks PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir [52].
- **Nested PCR:** Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizinin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PCR yöntemleriyle bazen mümkün olmayabilir. Eğer amplifikasyonu yapmaya çalıştığımız fragment uzunluğunda non-spesifik fragment(ler) amplifiye olmuş ise bu bizi yanlış sonuca götürebilir. Bundan kaçınmak için Nested PCR yöntemi uygulanır [52].

2.2.4.2 Çoğaltılmış Parça Uzunluk polimorfizm (AFLP)

AFLP tekniği, RFLP tekniğinin kesme-tanıma kısımlarının PCR ile çoğaltılmasına dayalı bir DNA markır tekniğidir. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı veya polimorfizmi anlamına gelen AFLP tekniği RAPD tekniğini ile RFLP tekniğinin birleştirilmiş formu olup RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir [53]. AFLP, toplam DNA'nın kesildikten sonra PCR reaksiyonuyla çoğaltılması esasına dayanan güçlü bir tekniktir. Bu teknikte genomik DNA genellikle önce birisi altı, diğeri dört bazı tanıyan iki kesim enzimi (RE) tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir (Adaptör). Eklenen sentetik DNA'nın yani adaptörün nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar yani primerlerin kullanımıyla nisbeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltma iki aşamada gerçekleştirilir [54].

2.2.4.3 Ampification Refractory Mutation System- Polymerase Chain Rection (ARMS-PCR)

ARMS-PCR yöntemi genomik DNA'daki nokta mutasyonlar ve küçük delesyonlar veya insersiyonların tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır. 1989 yılında tanımlanmış olan bu yöntem birbirini tamamlayan iki reaksiyon basamağında gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklardan biri mutasyona diğeri normal diziye spesifik primerler içerdiği için bu yöntemle kişide mutasyon olup olmadığı ortaya konduğu gibi homozigot/heterozigot ayrımının yapılmasını da sağlanmaktadır [55].

2.2.4.4 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA'nın birincil yapısının en yüksek çözünürlüğüdür. Diğer yöntemlerle tanımlanamayan mutasyonları incelemenin en etkin yoludur. Radyoaktiviteyle çalışılan manüel şekli, son yıllarda yerini floresan markalı kimyasallarla çalışılan otomatik yönteme bırakmıştır. Türkiye'de sadece birkaç laboratuvarında bulunan yüksek maliyetli cihaz, şimdilik sadece gelişmiş araştırma ünitelerine kısıtlı olmakla birlikte, bir teknisyen gözetiminde klinik ortamda da kullanılmaya elverişlidir [56].

2.2.4.5 StripAssay Yöntemi

İnsan DNA'sında çeşitli hastalıklara neden olan bazı önemli değişimlerin (mutasyon) strip üzerinde tespiti sağlayan moleküler bazlı sistemlerdir. Çeşitli örneklerden (kan gaita gibi) genomik DNA elde edilir ve biyotin işaretli primerlerin kullanıldığı mültipleks PCR ile mutasyonlu ve normal gen bölgeleri çoğaltılır. PCR ürünleri nitroselüloz membran üzerindeki allel-spesifik problara hibridize edildikten sonra görünür hale getirilerek değerlendirme yapılır [57].

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Haziran 2012 ve Mayıs 2013 tarihleri arasında yapıldı. Araştırmanın ilk aşaması olan DNA izolasyonu 2012 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi. 2013 yılında ise kalan laboratuvar çalışmaları Kafkas Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'nda tamamlandı.

3.1 Hasta Grubu Bireylerin Seçimi

Hasta grubu, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Polikliniği'nde takipleri devam eden veya yeni ön tanı konulan Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) olgularından oluşturuldu. Kontrol grubu olarak ailesinde ve kendisinde AAA anamnezi olmayan sağlıklı bireyler cinsiyet farkı gözetilmeksizin seçildi. Çalışma süresince toplamda 78 FMF hastası hasta grubu olarak ve 100 sağlıklı birey kontrol grubu olarak incelemeye alındı. Hasta bireylerin her bir bireyinden EDTA'lı, tüpe 8 ml kan alınarak, DNA'larını izole etmek için -20 °C'de saklandı.

Çalışmaya dahil edilen bütün hastalara hastalıkları ile ilgili 21 soru içeren bir anket uygulanmıştır. Bu ankette epidemiyolojik veriler, memleketleri, aile ağaçları, aile öyküleri, tanı yaşları, klinik bulgular, beraberinde görülen hastalıklar, tedaviye başlanma zamanı, tedaviye yanıt ve tedavi uyumu gibi doğrudan doğruya hastalık ile ilgili bir takım kriterleri ve bilgileri içeren veriler bulunmaktadır.

3.2 Hastalar ve Demografi:

Çalışmaya alınan 19 aileye ait 78 bireyden 38'i kadın (% 48,71) ve 40'i erkektir (% 51,29). Bu hastaların cinsiyete ve yaşa göre dağılımı Çizelge 3.2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.1: Hastaların cinsiyet ve yaşlara göre dağılımı

	Kadın n	%	Erkek n	%
18-20 yaş	11	14,10	16	20,51
20-40 yaş	13	16,66	12	15,38
40-60 yaş	10	12,82	6	7,69
>60 yaş	4	5,12	6	7,69
Toplam	38	48,71	40	51,29

Hastalarda klinik olarak en sık yakınma karın ağrısı (% 50) ve ateş (% 44,87) iken artrit/artralji (% 24,35) ve Erizipel benzeri eritem (% 6,41) izlenmekteydi (Çizelge 3.2.2)

Çizelge 3.2.2: Hastaların klinik özellikleri

Özellikler	Hasta	%
Karın ağrısı	39	50
Ateş	35	44,87
Artrit/artralji	19	24,35
Erizipel benzeri eritem	5	6,41

3.3 Kontrol Grubu Bireylerinin Seçimi:

Çalışmamızda gönüllü olarak kan vermek isteyen ve Kızılay kan toplama kampanyalarında gönüllü olarak kan veren bireylerden kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu bireylere Gönüllüleri Bilgilendirme Olur formu düzenlenmiştir. Her bir bireyden EDTA'lı, tüpe 8 ml kan alınarak, DNA izolasyonu için -20 °C'de saklandı.

3.4 Kullanılan Kimyasallar

<u>Kullanılan kimyasallar</u>	<u>Marka</u>
• Potasyum Hidrojen Karbonat(KHCO ₃)	MERCK
• Sodyum Klorür(NaCl)	MERCK
• Borik Asit(B(OH) ₃)	SIGMA ALDRICH
• Agaroz (C ₂₁ H ₂₀ Br N ₃)	SIGMA ALDRICH
• Alüminyum Klorür(AlCl ₃)	SIGMA ALDRICH
• Sodyum Dodesil Sülfat	SIGMA ALDRICH
• 10X Tris-Borate EDTA	VIVANTİS
• Tris Hidroklorür(Tris-HCl)	SIGMA ALDRICH
• Sodyum Hidroksit(NaOH)	SIGMA ALDRICH

3.5 Kullanılan Araç ve Gereçler

<u>Kullanılan Araç ve Gereçler</u>	<u>Marka</u>
• EDTA'lı steril kan tüpü (10ml)	VACUTEST
• Su Banyosu	MEMMERT
• PCR	BİONEER
• Elektroforez	THERMO SCIENTIFIC
• Nanodrop ND-1000	THERMO SCIENTIFIC
• Jel Görüntüleme Cihazı	GEL LOGIC 2012 PRO
• Soğutmalı Santrifüj	NUVE NF 400R

• Etüv	NUVE FN 500
• Mini Santrifüj	SCAN SPEED
• Çeker Ocak	LABOR KİMYA
• Mikrodaga Fırın	BEKO
• Derin Doldurucu	ARÇELİK
• Vorteks	VELP SCIENTIFICA
• Hassas Terazı	SCALTEC
• Cam Şişeler	ISO LAP
• Pı kro Pipet ve uçları	EPPENDORF
• Beher	ISO LAP
• Eldıven	BEYBİ
• Buz Aküsü	
• Spor	EPPENDORF
• Falkon Tüp (50ml)	ISO LAP
• Eppendorf Tüp (1ml)	EPPENDORF
• Mezür	ISO LAP
• Manyetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA

3.6 Kullanılan Solüsyonlar

Eritrosit Lizis Buffer(ELB):

82,9 GR NH₄Cl, 10 gr KHCO₃ ve 0,5 M'lık 20 ml EDTA eklenir ve 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.

Nükleer Lizis Buffer(NLB):

10 ml Tris-HCl, 4 ml EDTA ve 24 gr NaCl eklenerek 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.

Tris-HCl(1M):

12,1 gr Trisbase 80 ml saf suda çözünür ve 100 ml'ye tamamlanır.

EDTA (Etilendiamintetra Asetik Asit) :

18,6 gr EDTA 80 ml saf suda çözünür, Ph'ını ayarlamak için NaOH konur ve 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS):

10 gr SDS 60 ml saf suda çözünür ve 100 ml'ye tamamlanır.

NaCl(6M):

87,96 gr NaCl 250 ml'lik saf suda çözünür.

Proteinaz-K:

20 mg'lık proteinaz-K 1 ml saf suda sulandırılır.

Tris-Borik Asit-Edta Buffer(TBE):

5X'lik TBE buffer için 54 gr Trisbase, 27.5 gr Borik Asit ve 20 ml 0.5 M EDTA konur ve 1000 ml'ye tamamlanır.

3.7 Periferik Kanda DNA İzolasyonu

10ml'lik EDTA'lı tüplere 8ml kan alındı. Alınan kanlar -20°C'de saklanır ve bu kanlar DNA izolasyonunun ilk basamağında 37°C'deki su banyosunda 30 dk. bekletildi. Falcon tüplere alınan kanın üzerine 40 ml Eritrosit Lizis Buffer eklenerek hafifçe çalkalandı ve buz dolu kabın içerisinde 30 dk. bekletildi. Daha sonra tüpler 4°C'de 10 dk. 2500 rpm'de santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve pellet üzerine tekrar 40ml Eritrosit Lizis Buffer eklenerek iyice çalkalandı, +4 °C'de 10 dk. 2500 rpm'de santrifüjde edildi. Tüplerin üzerindeki süpernatant kısmı tekrar uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine bu kez 25ml Eritrosit Lizis Buffer eklendi ve iyice çalkalandı. Daha sonra 4°C'de 10 dk. 2500 rpm'de santrifüj edildi ve pelletin üzerine 4 ml Nüklear Lizis Buffer ve 10µl Proteinaz-K eklenerek hızlıca karıştırıldı. Üzerine 425µl Sodyum Dodesil Sülfat eklendi ve 37°C'de etüvde bir gece bekletildi.

DNA izolasyon işleminde ikinci gün etüvde bir gece beklettiğimiz tüplerimizi etüvden çıkardıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 1,4 ml NaCl(tuz) eklenir ve hızlıca çalkalandı 20°C’de 15 dk. 4000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra bu sefer supernatant temiz falkon tüpe alınarak tekrar 20°C’de 20 dk. 4000 rpm’de santrifüj edildi. İşlem bittikten sonra tekrar süpernatant kısmı 20 ml’ye tamamlanacak şekilde %96’lık Etil Alkol eklendi ve 1- 2 dk. bekletildi. Bu aşamadan sonra ise DNA’lar 1.5ml’lik eppendorf tüplere alındı ve üzerine 500µl %70’lik Etil Alkol eklenerek 45 sn. 1000 rpm’de santrifüj edildi saf (steril) su içerisinde -20°C’de saklandı.

3.8 DNA Konsantrasyonunun Nanodrop Spektrofotometrede Ölçümü

Elde edilen DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) kullanılarak ölçüm yapıldı. DNA’nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 500µl ile sulandırılmış DNA örneğinden 1µl alınarak nanodrop cihazına yüklenir ve ölçüm yapılır. İzole ettiğimiz DNA örneklerinde ortalama miktar 100 ile 500 ng/µl arasında gözlemlendi.

3.9 FMF’li Hastalarda ve Kontrol Gruplarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Mutasyon Analizi

Optimum çoğalmanın gerçekleştiği PCR karışımı: 10X’lik tampon çözeltisinden 5µl, magnezyum klorür (50mM) 5µl, dNTP mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 5µl, ileri primer (2.5pmol/µl) 5µl, geri primer (2.5pmol/µl) 5µl, genomik DNA (100ng/µl) 2µl, DNA taq polimeraz enzimi (5u/µl) 1µl ve son olarak toplam hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Çizelge 3.9.1: M694V ile E148Q mutasyonları için optimum çoğalmanın gerçekleştiği PCR reaksiyonu karışımı.

Stok Konsatrasyonu	Miktar (μl)	Son Konsantrasyon
PCR tamponu (10 X)	5 μ l	5X PCR tamponu
MgCl (50mM)	5 μ l	2.5mM
İleri primer (2,5 pmol/ μ l)	5 μ l	12.5 pmol
Geri primer (2,5 pmol/ μ l)	5 μ l	12.5 pmol
dNTP'ler	5 μ l	0.5 mM
Genomik DNA (100 ng/ μ l)	2 μ l	200 ng
Taq DNAPolimeraz (5U/ μ l)	1 μ l	5U
Steril bidistile su	22 μ l	
Toplam Hacim	50μl	

Çizelge 3.9.2: M694V PCR yöntemi için kullanılan primer dizileri.

GEN	PRİMER
MEFV:	
M694V: İleri primer:	5'-ACTCTGTCGCCAGAGAATGGCTACTGGGTGGAGATAAATG-3'
Geri primer:	5'-GTCAGGCCCTGACCACCCACTGGACAG-3'

Çizelge 3.9.3: E148Q PCR yöntemi için kullanılan primer dizileri.

GEN	PRİMER
MEFV:	
E148Q:	İleri primer: 5'-GCCTGAAGACTCCAGACCACCCCG-3' Geri primer: 5'-AGGCCCTCC-GAGGCCTTCTCTCTG-3'

Çizelge 3.9.4: M694V ve E148Q mutasyonları için uygun PCR programı

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	3 dk.	1
Denatürasyon	94	1 dk.	
Primer bağlanması	58	1 dk.	40
Zincir Uzaması	72	1 dk.	
Son Uzama	72	10 dk.	1

3.10 Agaroz Jel Elektroforezi

%2'lik; 150 ml TBE çözeltisi içerisine 3 gram agaroz ve 2 µl Etidyum Bomür (EtBr) eklenir ve traye dökülür ve polimerize olması için en az 15 dk bekletilir.

15µl'lik örnek PCR ürünü jel loading solusyonu ile beraber jele yüklenir ve 90 Voltta 60 dakika yürütülür. Pozitif örneklerin belirlenmesi için DNA markeri olarak 100 bp DNA ladder kullanılır. Daha sonra jel resimleri çekilerek pozitif ve negatif örnekler belirlenir.

3.11 İstatistik Analizi

Bu çalışmada istatistiksel analizler GraphPad Prism paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra ikili grupların karşılaştırmasında student testi, nitel verilerin karşılaştırmalarında Fisher gerçeklik testi kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesine $\alpha:0.05$ anlamlılık düzey esas alınmıştır.

4. BULGULAR

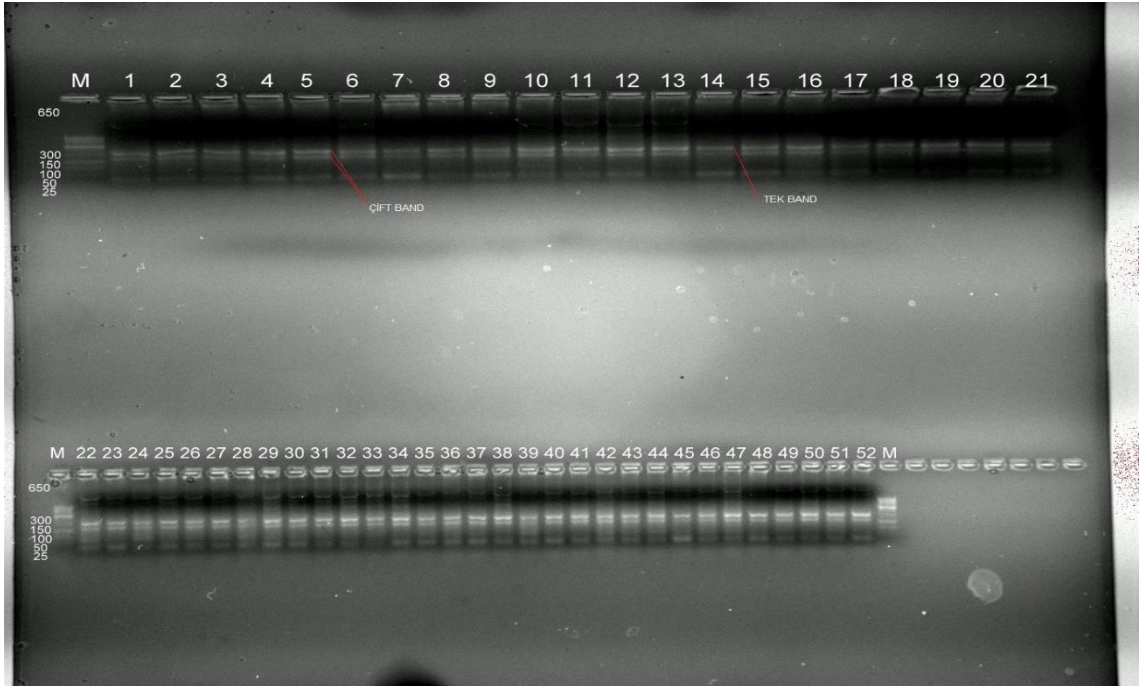
Çalışma grubumuzdaki FMF'li 78 hastanın genomik analizler sonucu MEFV geni M694V mutasyonuna 78 kişinin tamamında % 100 oranında rastlandı. M694V mutasyonu çalışılan 100 kontrol grubunun 26'sında (%26 oranında) görüldü. E148Q mutasyonu ise 28 kişide (%35,89 oranında) gözlemlendi ve kontrol gruplarında ise bu mutasyon 100 kişiden 8'inde (% 8 oranında) görüldü. Her iki mutasyonun görülme oranı ise 28 kişide (%35,89) şeklinde gözlemlendi.

Çizelge 4.1: MEFV Geni mutasyonlarının dağılımı

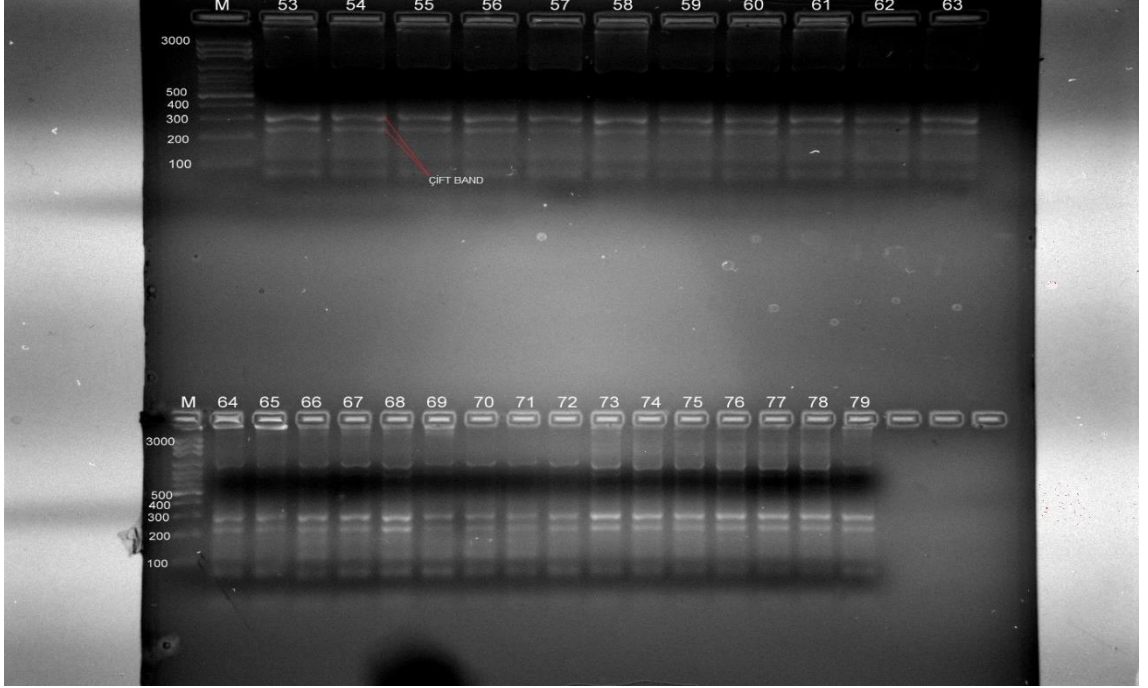
Mutasyon tipi	Hasta	%
M694V	78	100
E148Q	28	35,89
M694Vve E148Q	28	35,89

Çizelge 4.2: Mutasyonların cinsiyetlere göre dağılımı

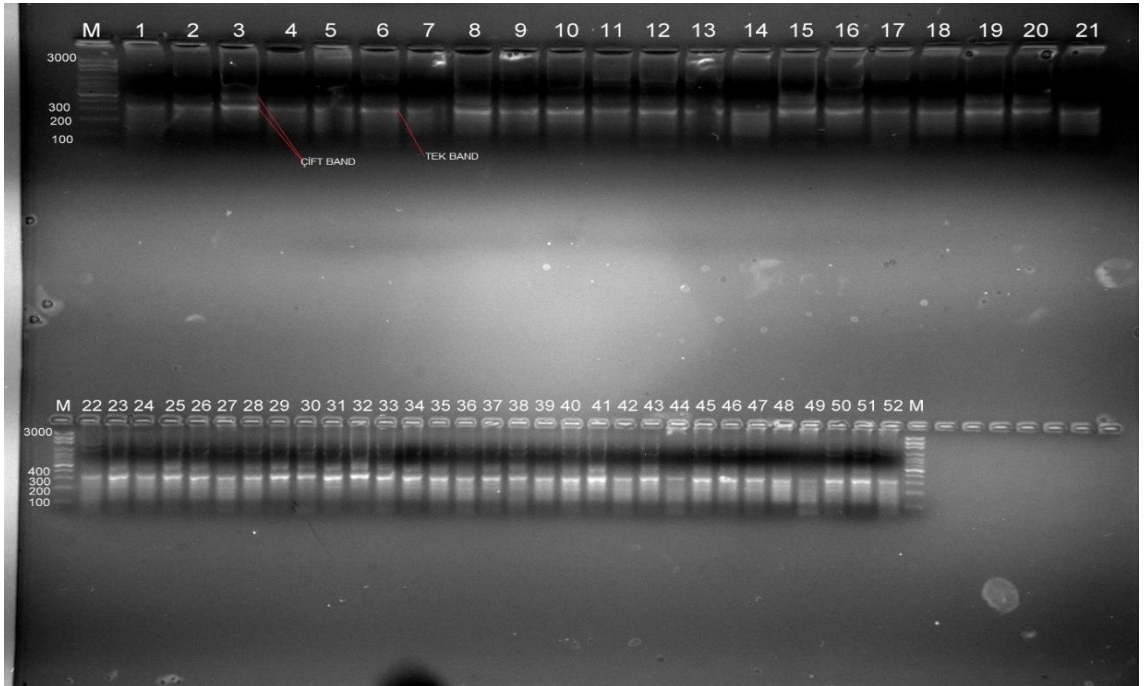
Mutasyon	Kadın	%	Erkek	%
M694V	38	48.71	40	51.28
E148Q	12	15.38	16	20.51
M694V/E148Q	12	15.38	16	20.51



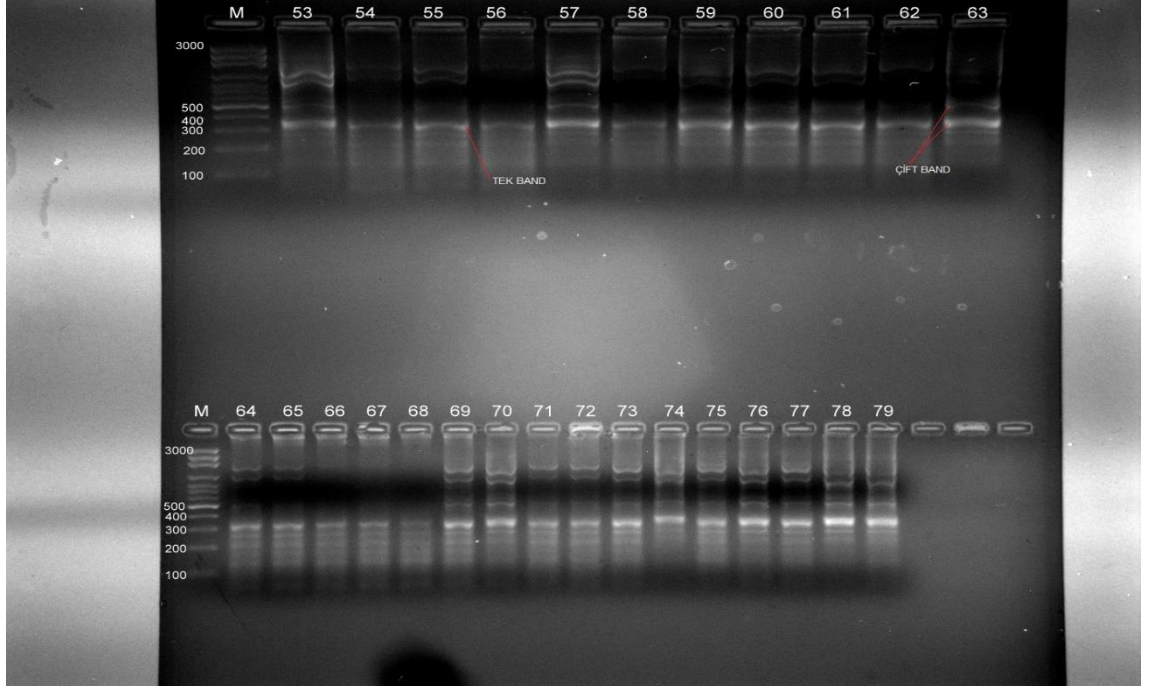
Resim 4.1: M694V mutasyonunun jel resimleri



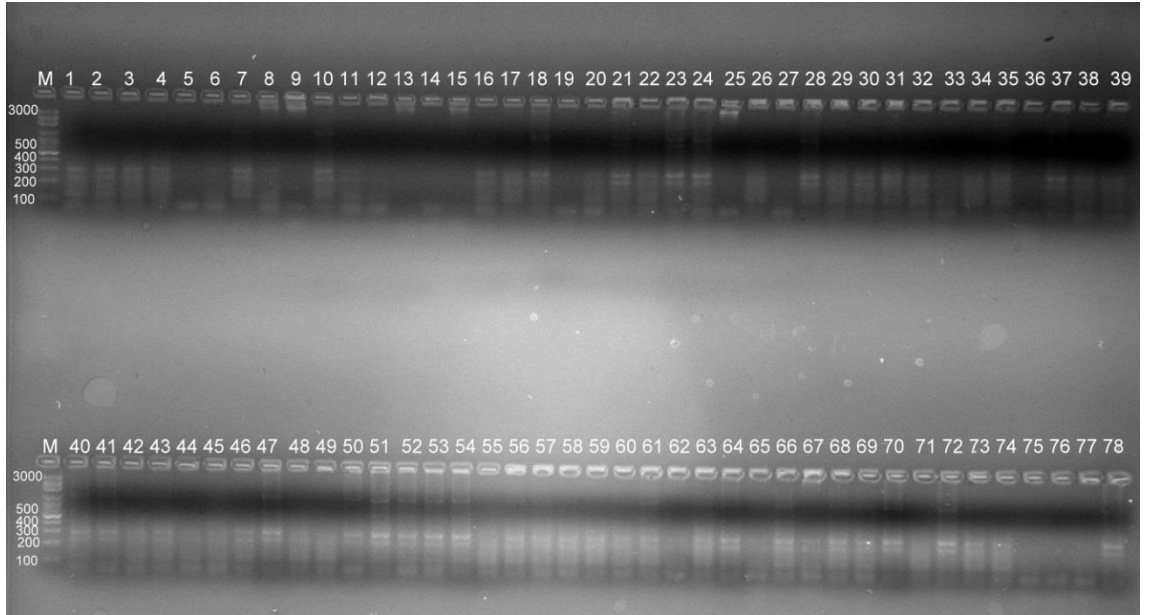
Resim 4.2: M694V mutasyonunun jel resimleri



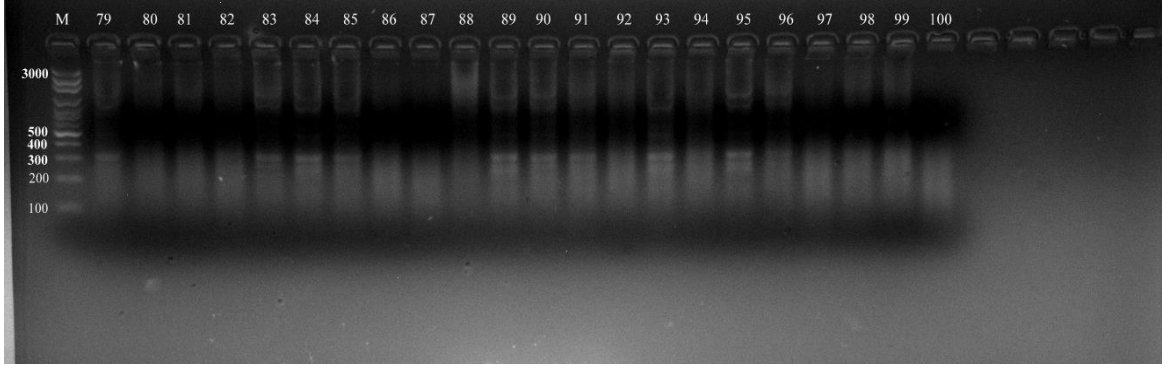
Resim 4.3: E148Q mutasyonunun jel resimleri



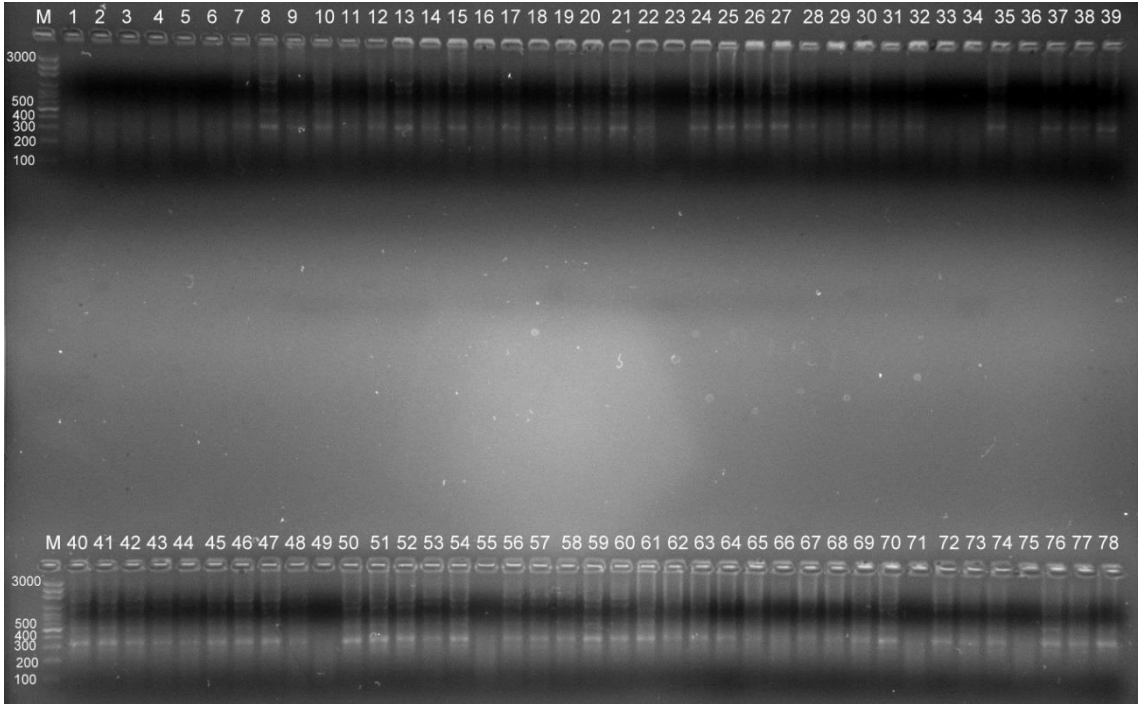
Resim 4.4: E148Q mutasyonunun jel resimleri



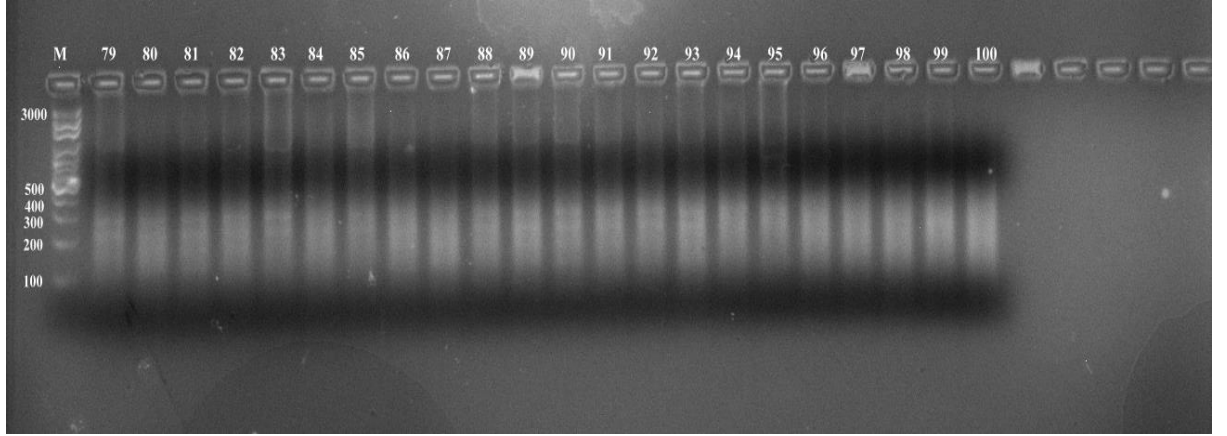
Resim 4.5 : Kontrol Grubu M694V mutasyonunun jel resimleri



Resim 4.6 : Kontrol Grubu M694V mutasyonunun jel resimleri



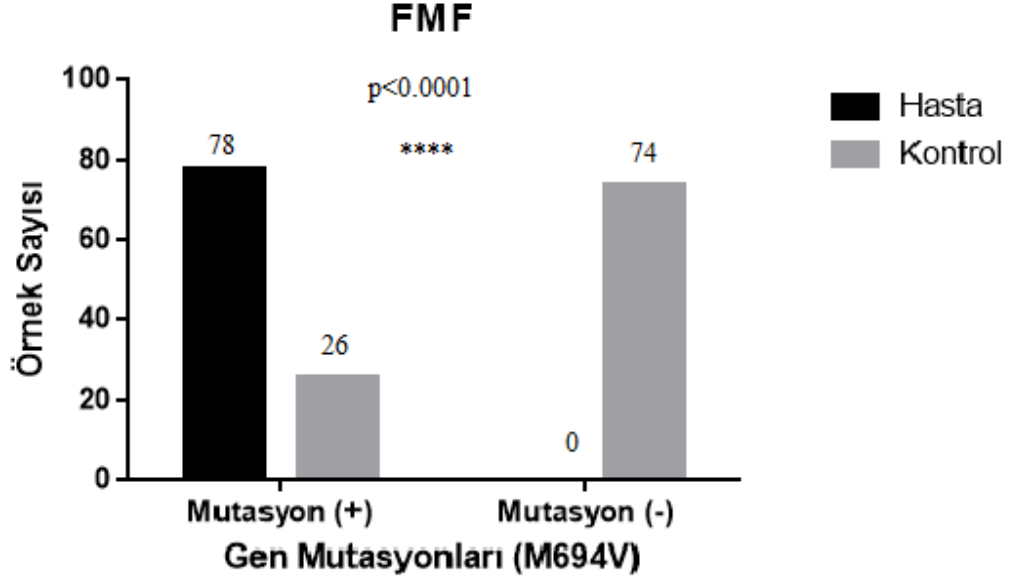
Resim 4.7: Kontrol Grubu E148Q mutasyonunun jel resimleri



Resim 4.8: Kontrol Grubu E148Q mutasyonunun jel resimleri

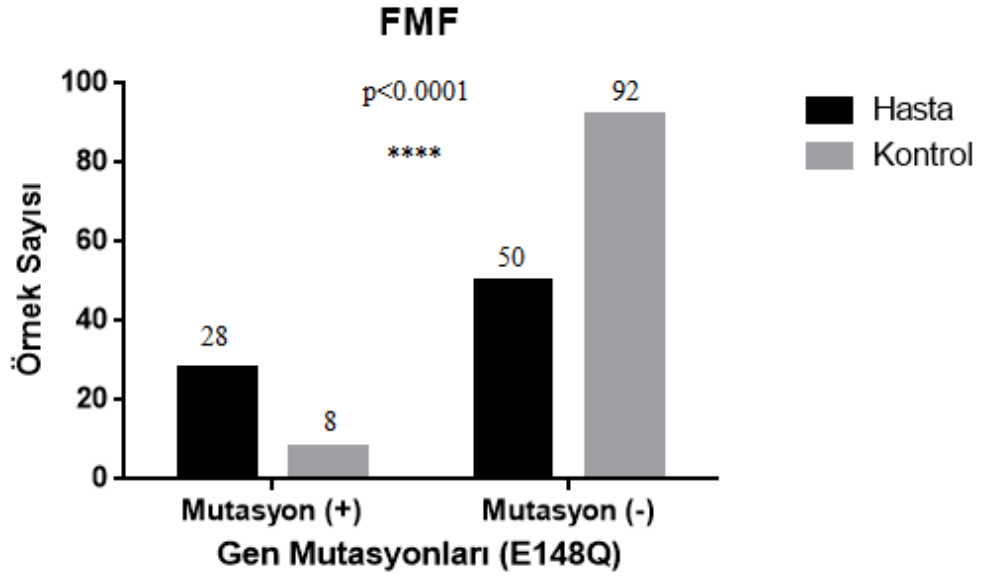
Çizelge 4.3: M694V mutasyonunun hasta kontrol grubuna göre dağılımı

	Hasta	Kontrol	Toplam
Mutasyon (+) (M694V)	78	26	104
Mutasyon (-) (M694V)	0	74	74
Toplam	78	100	178



Çizelge 4.4: E148Q mutasyonunun hasta kontrol grubuna göre dağılımı

	Hasta	Kontrol	Toplam
Mutasyon (+) (E148Q)	28	8	36
Mutasyon (-) (E148Q)	50	92	142
Toplam	78	100	178



5. TARTIŞMA

Çalışmamız Doğu Akdeniz Bölgesinde Hatay ilimizde yaşayan 19 farklı ailenin toplam 78 bireyinde MEFV geni içinde yer alan M694V ile E148Q mutasyonlarının popülasyonda yaygınlığını incelemek amacıyla yapıldı. Çalışmamız ailesel düzeyde FMF hastalarında MEFV geni M694V ile E148Q mutasyonlarının incelenmesi açısından Türkiye’de ilk olduğunu düşünmekteyiz.

MEFV geni M694V, mutasyonu Akdeniz Bölgesi popülasyonlarında en sık bulunan 10. Ekzondan kaynaklanan mutasyondur. Onuncu ekzon bölgesi dışında farklı ekzon bölgelerinde (2, 3 ve 5.ekzonlarda) AAA hastalığından sorumlu olan başka mutasyonlarda bulunmaktadır [3]. MEFV geni E148Q mutasyonu sekans varyantı olarak 2. eksonda tanımlanan ve FMF hastalığından sorumlu olan bir mutasyondur. Bazı çalışmalarda bu iki mutasyonun (M694V, E148Q) Orta Doğu bölgesindeki AAA hastalarındaki mutasyonların %85’inden fazlasından sorumlu olduğunu bildirilmektedir. Şimdiye kadar bu mutasyonlarla ilgili olarak 180’den fazla varyant değişikliği bildirilmiştir. Fakat bunların birçoğu rölatif olarak nadir görülen, klinikte fenotipi olmayan ve sıklıkla da AAA hastalığının sık olarak görülmediği popülasyonlarda bulunmuştur [3].

M694V mutasyonu, Ashkenazi olmayan Yahudiler, Türkler, Araplar ve Ermenilerde en sık gözlenen mutasyondur [43]. Kuzey Afrikalı Yahudilerde % 97 oranında taşıyıcı kromozomda gösterilirken, Iraklı Yahudilerde % 30, Ermenilerde ise % 25 oranında bulunmuştur. Riva Brik ve arkadaşlarının İsraili 67 çocuk üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada Yahudi kökenli çocuklarda (Kuzey Afrika veya Iraklı Yahudiler) M694V mutasyonunu en az bir alleli üzerinde taşıyan çocukların % 92 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Arap çocuklarda (Hristiyan, Müslüman, Dürzi) M694V mutasyonunun % 30 oranında görüldüğü, gösterilmiştir [51].

E148Q mutasyonunun ise Avrupa'da yaygın olduğu belirtilirken ülkemiz için İç Anadolu Bölgesinde yapılan ve ailevi olmayan bir çalışmada sıklığı %13 olarak rapor edilmiştir. Bu mutasyonun fenotipik etkisi ile ilgili farklı yorumlar çeşitli çalışmalarda verilmektedir. 2001 yılında ABD'de yapılan çalışmada E148Q mutasyonu bakımından homozigot olanların hasta olmadığı, hastalığın ortaya çıkması için başka mutasyonların da gerektiği vurgulanırken [59] bir başka çalışmada ise bu mutasyonun FMF'in patofizyolojisinde rol oynadığı belirtilmektedir [60]. Tchernitchko ve ark. ise E148Q'nun polimorfik bir varyant olduğunu ve zararlı olmadığını belirtmektedir.

Touitou, 2001 yılında Fransa'da yayınlanan bir çalışmasında, değişik popülasyonlarda MEFV gen mutasyon sıklıklarını incelemiştir. 1301 Yahudi hastada en sık görülen mutasyon % 65 ile M694V olarak bulunmuş, bunu % 5 ile E148Q takip etmektedir. Ermeniler 'de ise 378 hastadan oluşan grupta, en sık mutasyon % 37 ile M694V bulunmuş. E148Q ise % 2 olarak bulunmuştur. Araplar 'da 706 hasta içeren bir grupta, M694V % 20 ile en sık görülen mutasyon olurken, E148Q mutasyonu % 6 sıklıkta gözlenmiştir. Türkler 'de ise aile bağı olmayan 1390 hastadan oluşan grupta, M694V % 45 sıklıkla en sık saptanan mutasyon olurken, E148Q mutasyonu % 2 sıklıkta saptanmıştır [10].

Stoffman ve ark.'nın 2000 yılında İsrail'de Yahudi toplumunda yapmış oldukları FMF mutasyon tarama çalışmalarında; sağlıklı bireylerde mutasyon tiplerini M694V % 29, E148Q % 53 olarak bulmuşlardır. Buna karşın hastalarda M694V % 84,4, E148Q % 6,6 değerindedir. Bizim çalışmamıza göre Yahudi toplumunda M694V görülme frekansı toplumumuzdan daha yüksektir. Yılmaz ve ark.'nın Ülkemizde 1999 yılında yaptıkları

çalışmada sağlıklı bireylerdeki E148Q mutasyonu frekansı sonuçları bizim sonuçlarımızla yakın değerdedir [61].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda genel olarak MEFV geni mutasyonlarının taşıyıcılık sıklığı açısından yeterli bilgiye sahip olmamamıza rağmen, farklı yörelerde yapılan genetik çalışmalarda bölgesel olarak taşıyıcılık oranından bahsedilmektedir. En geniş şekilde bilgilerin toplandığı Türk FMF Çalışma Grubu'nun 2005 yılında Antalya'da derlemiş olduğu verilere göre oldukça geniş hasta ve sağlıklı grup değerlendirilmiştir [62]. Bu değerlendirme raporuna göre 1090 hastada genetik analiz yapılmış ve sıklıkla görülen mutasyon tipleri M694V % 51,4 bulunmuştur [62]. FMF Çalışma Grubu'nun yaptığı çalışmadan yola çıkarak bizim araştırdığımız iki mutasyon tipinin tayini ile hastaların büyük bir kısmında genetik tanı konulabileceği düşünülmektedir. Tepecik Eğitim Hastanesi Doku Tipleme ve Moleküler Tanı Laboratuvarında FMF tanısıyla MEFV gen mutasyon analizi araştırılmış ve en sık saptanan % 48,4 ile M694V mutasyonu bulunmuştur. E148Q mutasyonu oranı ise % 16,5 sıklıkla bulunmuştur [63].

Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Romatoloji polikliniğinde izlenmekte olan çocuk yaş grubundan 123 hastada sık görülen mutasyon M694V'dir ve % 57,7 oranındadır [32].

Çizelge 5.1 M69V ile E148Q mutasyonları üzerinde yapılan bazı çalışmaların sonuçları

	M694V	E148Q
Stoffman ve ark.	% 84,4	% 6,6
Touitou, ve ark 2001	% 65	% 5
Türk FMF Çalışma Grubu	% 51,4	—
Tepecik Eğitim Hastanesi	% 48,4	% 16,5
Mevcut Çalışmamız	%100	35,89

Bizim sonuçlarımıza göre mutasyonların aile gruplarındaki görülme sıklığı sırasıyla M694V mutasyonu için %100 ve bu grubun sağlıklı bireyleri için %26'dır. Aile grupları düzeyinde yapılan bu araştırmanın incelediğimiz popülasyon açısından klinik tanılarda

kullanılabileceği görüşündeyiz. Araştırdığımız ikinci mutasyon tipi ola E148Q oranı ise %35,89 olarak bulundu. Bu mutasyonun sağlıklı bireylerinde varyantı %8 olarak gözlendi. Literatürlerde E148Q mutasyonunun FMF hastalığına daha az duyarlı olduğundan klinik tanı katkısı az alacağı kanısındayız.

Sonuç olarak, Türkiye'nin birçok yerinde olduğu gibi, incelediğimiz Hatay yöresi popülasyonunda daha geniş gruplu çalışmalar yapılarak FMF hastalarında görülen bu iki mutasyonun frekanslarının azda olsa değişebileceğini düşünmekteyiz. MEFV geni mutasyon tiplerinin bilinmesi ve hastalığın tedavisinin göz önünde bulundurulması FMF komplikasyonlarını azaltabilir. Çalışmamızda Hatay'da M694V mutasyonunun daha sık olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyon tipi amiloidoz için yüksek risk faktörü olduğu için FMF hastalarımızın takip ve tedavisinde amiloidoz için dikkatli ve titiz olunması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] <http://www.msxlabs.org/forum/soru-cevap/227025-genetik-hastaliklar-nelerdir.html#ixz1yKIlvIWKGünümüzde>
- [2] Önen F. Familial mediterranean Fever. *Rheumatol Int.* 2006 Apr; 26 (6): 489-96
- [3] Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet.* 1998 28;351:659-664
- [4] Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, et al. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992; 326:1507-13.
- [5] International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the Roret gene family cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90:797-807.
- [6] French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature Genetics* 1997; 17:25-31.
- [7] Örün E, Yalçinkaya F, Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Ve Amiloidoz Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi I Official Journal of the Turkish Society of Nephrology 2003; 12: 1-7
- [8] International Human Genome Sequencing Consortium (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome.". *Nature* 431 (7011):931–45.doi:10.1038/nature03001. PMID 15496913.<http://www.nature.com/nature/journal/v431/n7011/full/nature03001.html>
- [9] Science 316 p 1113 25-May-2007, gen sayısı muhtemelen 20.488-20.588 arasındadır)
- [10] Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:473-83.
- [11] Sohar E, Gafni J, Pras M et al; Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 1967; 43: 227-53.

- [12] Arısoy N, Kasapçopur Ö, Sever L, Çalışkan S, Yazıcı H, Özdoğan H; Familial Mediterranean Fever in Turkish Children, In: First International conference on familial Mediterranean fever proceedings book, London and Tel Aviv: Freund 1997; 168-72.
- [13] Janeway TC, Mosenthal HO. An unusual proxymal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of nitrogen metabolism. *Trans Assoc Am Phys.* 1908; 23:504-18.
- [14] Siegal S. Benign paroxymal peritonitis. *Ann Intern Med* 1945; 22:1-21.
- [15] Reimann HA, Periodic disease. Probable syndrome including periodic fever, benign paroxysmal peritonitis, cyclic neutropenia and intermittent arthralgia. *JAMA* 1948; 136:239.
- [16] Mamou OH. La Maladie Periodique. L'Expansion Scientifique Française. Paris, 1956.
- [17] Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean fever. *Arch Int Med* 1958; 102:50.
- [18] Abrevaya Marmaralı: Garip bir karın ağrısı sendromu. *Türk Tıp Cem Mec* 1946; No:12.
- [19] Goldfinger SE: Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Eng J Med* 1972; 287:1302.
- [20] Özkan E, Okur O, Ekmekci A, Ozcan R, Tag T: A new approach to the treatment of periodic fever. *Med Bull İstanbul* 1972; 5:44-49.
- [21] Kavak U.S., Özen S., 'Ailesel Akdeniz Ateşi', Hacettepe Ü. Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. AD. Nefroloji Ün., *sted* 12, 4, 137 (2003)
- [22] Kone-Paut I, Dubuc M, Sportouch J, et al. Phenotype-genotype correlation in 91 patients with Familial Mediterranean Fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. *Rheumatol*; 39:1275-1279. (2000)
- [23] Livneh A, Langevitz P, Zemer D et al. The changing face of Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26: 612-27.
- [24] Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y et al. Familial Mediterranean Fever at the Millennium. *Medicine* 1998; 77: 268-97.
- [25] Bakkaloğlu A., 'Familial Mediterranean fever', *Pediatr Nephrol.* 18:853-859 (2003)

- [26] Pay S, Turan M, Simsek I. Prevalence of Familial Mediterranean Fever in young Turkish men. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:292.
- [27] Zimand S, Tauber T, Hegesch T, Aladjem M. Familial Mediterranean fever presenting with massive cardiac tamponade. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:67.
- [28] Koşan, C., 2003. Ailevi Akdeniz ateşine tanısal yaklaşım: *AÜTD* 35:1-6
- [29] Erdogan, Ö., Öner, A., 2002. Ailevi Akdeniz ateşi: *T.Klin Pediatri* 11:160-170
- [30] Majeed HA, Rawashdeh M, El Shanti H, Qubain H, Khuri-Bulos, Shahin M. Familial Mediterranean fever in children: the expanded profile. *Q J Med*;92:309-18 (1999)
- [31] Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z, Farwana S, Harshani F. The cutaneous manifestations in children with familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis). A six year study. *Q J Med*;75:607-16 (1990)
- [32] Doğan Demir A. ‘Çocukluk Çağı Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklerin Belirlenmesi ve Bu Özelliklerle Sık Görülen Mutasyonlar Arasındaki İlişkilerin Araştırılması’, Uzmanlık Tezi, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, İstanbul (2007)
- [33] Flatau E, Kohn D, Schiller D et al. Schönlein-Henoch syndrome in patients with FMF. *Arthritis Rheum*;25:42-47 (1982)
- [34] Langevitz P, Zemer D, Livneh A, Shemer J, Pras M. Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1994; 21: 1708-1709.
- [35] Kasapçopur Ö, Arısoy N. Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuar hastalıklar Familial Mediterranean Fever and other hereditary auto-inflammatory diseases. *Türk Pediatri Arşivi* 2006;41:9- 17.
- [36] Notarnicola, C., Mana, R., Rey, J., Touitou, I., 2001. The first nonsense mutation in familial Mediterranean fever: *Hum Mutat* 17:79
- [37] Touitou, I., Lesage, S., Mcdemott, M., Cuisset, L., Hoffman, H., Dade, c., Shoam, N., Aganna, E., Hugot, J.P., Wise, C., Waterham, H., Pugnere, D., Demaille, J., Menthiere, C.S., 2004. Infervers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes: *Human Mutation* 24:194-198

- [38] Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C., Kingma, D.W., Horwitz, M.E., Mansfield, E., Holland, S.M., 2000. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leucocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators: *Blood*. 95: 3223-3231
- [39] Goulielmos G.N., Fragouli E., Aksentijevich I., Sidiropoulos P., Boumpas D.T., Eliopoulos E., ‘Mutational analysis of the PRYSPRY domain of pyrin and implications for familial mediterranean fever (FMF)’, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 ,1326–1332 (2006)
- [40] Al-Alami JR, Tayeh MK, Najib DA, et al. Familial Mediterranean fever mutation frequencies and carrier rates among a mixed Arabic population. *Saudi Med J*; 24: 1055–59 (2003)
- [41] El-Shanti H., Abdel Majeed H., El-Khateeb M., ‘Familial Mediterranean fever in Arabs’, *Lancet* 367: 1016–24 (2006)
- [42] Yalçmkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, et al. Phenotype genotype correlation in a large group of Turkish patients with Familial Mediterranean fever: Evidence for mutation independent amyloidosis. *Rheumatology*.;39:67-72 (2000).
- [43] Tekin M, Yalçmkaya F, Çakar N, et al. MEFV mutations in multiplex families with Familial Mediterranean fever: Is a particular genotype necessary for amyloidosis? *Clin Genet*;57:430-437 (2000).
- [44] Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, et al. Pyrin/Marenostrin Mutations in Familial Mediterranean fever. *Q J Med*;91:630-636 (1998).
- [45] Özen, S., Besbas, N., Bakkaloğlu, A., Yılmaz, E.:Pyrin Q148 mutation and familial Mediterranean fever. *QJM* 95: 332-333, (2002).
- [46] Friman C, Pettersson T. Amyloidosis. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:62-71.
- [47] Haimov-Kochman R, Ben-Chetrit E. The effect of colchicine treatment on sperm production and function: a review. *Hum Reprod*. 1998 ;13(2):360-2.
- [48] Centola M, Aksentijevich I, Kastner DL. The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum Mol Genet*. 1998;7(10):1581-8.
- [49] Moutereau S, Narwa R, Matheron C, Vongmany N, Simon E, Goossens M. An improved electronic microarray-based diagnostic assay for identification of MEFV mutations *Hum Mutat*. 2004;23(6):621-8.

- [51] Mikula M, Buller A, Sun W, Strom CM. Prevalence of known mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) in various carrier screening populations Genet Med. 2008;10(5):349-52.
- [52] Arı, Şule , 1999 , Ed. Temizkan, Güler; Arda, Nazlı, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, “DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması” ,Nobel Kitabevi, 57-67
- [53] www.biology.hacettepe.edu.tr/Molekuler
- [54] www.biology.ibu.edu.tr
- [55] Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J., and Markham, A.F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA: The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucl. Acid Res. 17:2503-2516.
- [56] Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, Prof. Dr. Rıza Durmaz
- [57] Başak AN. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komi-tesi Temel moleküler hematoloji kursu. 2005; 99-106.
- [58] Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Megarbane A. Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment Sante. 2004;14:261-6.
- [59] Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and co localizes withactin filaments. Blood 2001;98:851-9.
- [60] Ozen S, Besbas N, Bakkaloglu A, Yilmaz E. Pyrin Q148 mutation and familial Mediterranean fever. QJM 2002;95:332 –3.
- [61] Brik R, Shinawi M, Kepten I et al. Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. Pediatrics 1999; 103: 70.
- [62] Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K et al. Familial Mediterranean Fever: prevalance, penetrance and genetic drift, Eur J Hum Genet2001;9:634-37.
- [63] Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean Fever in Turkey; Results of a Nationwide Multicenter Study. Medicine2005;84;1:1-11.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özkan ÖZTAŞ

Doğum Yeri: Antakya

Doğum Tarihi: 1986

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, Arapça

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Antakya Merkez 23 Temmuz

Lisans: Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü