



ARIS ÇAKIRIS

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2006

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ'NE BAĞLI İNFLAMATUAR
ATAKLARDA ASC, CASP-1 VE IL-1B GENLERİNİN
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

BİO. ARİS ÇAKIRİS

**DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET GÜL**

GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK ORTAK PROGRAMI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Genetik Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Aris Çakiris
Tez Başlığı : Ailevi Akdeniz Ateşi'ne bağlı inflamatuvar ataklarda ASC,CASP1 ve IL-1B genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. DETAE.
Sınav Tarihi : 20 / 07 / 2006

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof. Dr. Ahmet Gül (İ.Ü. İ.T.F. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji)
- 2.Prof. Dr. Uğur Özbek (İ.Ü. DETAE/Genetik Anabilim Dalı)
- 3.Prof. Dr. Turgut Ulutin (İ.Ü. C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- 4.Prof. Dr. Güher Saruhan-Direskeneli (İ.Ü. İ.T.F. Fizyoloji Anabilim Dalı)
- 5.Prof. Dr. Ersi Abacı-Kalfoğlu (İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü)

Amir Gül
Uğur Özbek
T. Ulutin
Güher Saruhan
Ersi Abacı-Kalfoğlu

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ARİS ÇAKIRIS

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü imkanı sağlayan D.E.T.A.E. Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın *Prof. Dr. Uğur Özbek'e*

Tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerini paylaşan, sabır gösteren, ilgi ve yardımını bence her tez danışmanından biraz daha fazla hissettiren tez danışmanım Sayın *Prof Dr. Ahmet Gül'e*,

Genetik eğitimim boyunca bilgilerini benimle paylaşan , fikir ve tecrübelerinden yararlandığım desteğini her zaman yanında hissettiğim bu alanı başka bir bakış açısıyla görmemi sağlayan sevgili abim *Dr. Duran Üstek'e*,

Tezimin teknik ve deneysel kısımlarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Cumhur G. Ekmekçi'ye ve sevgili Başar Oku'ya, son ve gizli destekçim olarak da aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-797/27122005 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kalıtsal Tekrarlayan Ateş Sendromları (Otoinflamatuvar Hastalıklar).....	3
2.2 Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	5
2.3 Ailevi Akdeniz Ateşi 'nde Başlıca Klinik Bulgular	6
2.3.1 Ateş	6
2.3.2 Karın ağrısı.....	6
2.3.3 Plevral ve perikardiyal semptomlar	6
2.3.4 Eklem bulguları.....	6
2.3.5 Dermatolojik semptomlar	6
2.3.6 Kas semptomları	7
2.3.7 Amiloidoz.....	7
2.4 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Patogenezi.....	7
2.4.1 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Patogenezinde İnflamasyonun Rolü:	8
2.4.2 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Tanı ve Tedavisi	9
2.5 MEFV Geni ve Mutasyonlar.....	10
2.6 Pirin-Marenostrin Proteini	12
2.6.1 Kriyopirin Proteini	16
2.7 Apoptoz ve İnflamasyon Mekanizması	17
2.8 Kaspazların Yapısı ve Sınıflandırması.....	18
2.8.1 Kaspazların Aktivasyonu ve Kaspaz Aktive Edici Platform	21

2.8.2 Kaspaz -1'in Aktivasyonunu Sağlayan NOD-LRR Ailesi Üyeleri.....	22
2.8.3 İnflamasyonda CASP1 (ICE / IL-1 β Dönüştürücü Enzim)'in Yeri ve Önemi.....	24
2.8.4 CASP1'in İmmün yanıtındaki rolü	26
2.9 Sitokinler.....	27
2.9.1 IL-1 Süper Ailesi ve IL-1 β	28
2.10 ASC'nin Fonksiyonu ve Moleküler Yapısı.....	30
2.11 Pirin, ASC, CASP1 ve IL-1 β mekanizması.....	32
2.11.1 Pirin ASC'a bağlı CASP1 aktivasyonunu indükler	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 GEREÇ	36
3.1.1 Hasta ve Kontrol Grubu	36
3.1.2 Bilgilendirilmiş onay formu.....	37
3.1.3 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	38
Etidyum Bromür.....	38
3.1.4 Kullanılan Cihazlar	39
3.2 YÖNTEM	40
3.2.1 Lökosit İzolasyonu.....	40
3.2.2 RNA İzolasyonu.....	40
3.2.2.1 Tam insan kanından total RNA izolasyonu	40
3.2.3 cDNA SENTEZİ	42
3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.2.4.1 Agaroz Jelin Hazırlanması ve Yüklenmesi	43
3.2.5 Primerler.....	43
3.2.6 Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR	46
3.2.6.1 Standart Eğri'nin Hazırlanması.....	46
3.2.6.2 Kantitatif PCR (QPCR) Materyali:	48
3.2.7 İstatistiksel Yöntemler	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	62
FORMLAR	74
ETİK KURUL KARARI	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kalıtsal Tekrarlayan Ateş Sendromları.....	3
Tablo 2-2: Tel-Hashomer kriterleri.....	9
Tablo 2-3: MEFV gen mutasyonlarının spektrumu (53)	11
Tablo 2-4: Belli başlı kaspazlar	18
Tablo 2-5: Kaspazların sınıflandırılması	19
Tablo 2-6: IL-1 süperailisinin üyeleri	29
Tablo 3-1: Kaspaz-1 primerleri.....	43
Tablo 3-2: ASC primerleri.....	44
Tablo 3-3: Kantitatif PCR koşulları.....	49
Tablo 4-1:Çalışmaya alınan AAA'lı, akut apendisitli ve sepsisli hastaların, cinsiyet ve yaş verileri ile CRP ve lökosit değerleri	50
Tablo 4-2: Melting curve değerleri.....	51
Tablo 4-3: İnflamasyon (akut atak ya da hastalık) ve asemptomatik dönemlerde CASP1, izoformlarının β 2-mikroglobulin genine oranla göreceli ifade birimleri (GİB) (ortalama $\pm$ standart sapma)	54
Tablo 4-4: İnflamasyon (akut atak ya da hastalık) ve asemptomatik dönemlerde ASC ve IL1- β genlerinin β 2-mikroglobulin genine oranla göreceli ifade birimleri (GİB) (ortalama $\pm$ standart sapma).....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Pirin proteininin bölgeleri (domain).....	13
Şekil 2-2: Pirin, DED, CARD ve DD bölgelerinin yapısal karşılaştırması (20)	15
Şekil 2-3: Pirin Bölgesi ve ilişkili olduğu proteinler (68)	16
Şekil 2-4: Apoptoz Basamakları	17
Şekil 2-5: İnflamatuar kaspazlar (77)	20
Şekil 2-6: Kaspaz aktive edici moleküllerin yapısı (77).....	21
Şekil 2-7: Kaspaz aktivasyon paltformu (77)	23
Şekil 2-8: Kaspaz-1 mRNA izoformları (93)	25
Şekil 2-9: İnterlökin 1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α)	27
Şekil 2-10: IL-1 β geni (106)	30
Şekil 2-11: ASC'ın yapısı ve diğer proteinlerle karşılaştırılması (112)	31
Şekil 2-12:ASC'ın 3 transkript varyantı	32
Şekil 2-13: ASC aracılı kaspaz1 oligomerizasyonunda pirin proteininin rolü (114)	33
Şekil 2-14: Patojen infeksiyonlarla uyarılan Pirin ve Kriyopirin inflamazomlarının oluşturdukları mekanizma (115).....	35
Şekil 3-1: Casp-1 transkript varyantlarının primer dizaynı	44
Şekil 3-2: ASC/TMS1 transkript varyantlarının primer dizaynı	45
Şekil 3-3: IL-1 β primer dizaynı	45
Şekil 3-4: pGEM vektörüne klonlanmış olan β 2-mikroglobulin geni	46
Şekil 3-5: Standart olarak kullanılan β 2-mikroglobulin genine ait erime eğrisi/melting curve.....	47
Şekil 3-6: Standart olarak kullanılan β 2-mikroglobulin genine ait standart eğri.....	47
Şekil 4-1: Hastalardan elde edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi	50
Şekil 4-2: cDNA sentezi kontrolü için HPRT geni kullanıldı.	51
Şekil 4-3: Akut appendisitli hastalardan bir ornekte (No:1) CASP1 gen ürünlerine ait melting curve değerleri ve grafikler.....	52
Şekil 4-4: AAA atak dönemi, 72 numaralı örnekte ASC ve IL-1B gen ürünlerine ait melting curve değerleri ve grafikler.....	52
Şekil 4-5: Genlerin ekspresyon dereceleri	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAA	: Ailevi Akdeniz Ateşi
MEFV	: MEditerranean FeVer
SAA	: Serum amiloid A
CRP	: C-reaktif protein
CASPASE-1(CSP1)	: Cysteine-containing aspartate-specific proteases, kaspaz1
ICE	: IL-1-Converting Enzyme
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
IFN- γ	: İnterferon- γ
sICAM-1	: İntersellüler Adezyon Molekülü-1
TRAPS	: TNF Reseptörü ile ilişkili Periodik Sendrom
MAPS	: Mevalonat Kinaz ile ilişkili Periodik Ateş Sendromu
MWS	: Muckle-Wells Sendromu
FCU	: Ailesel Soğuk Ürtikeri
CINCA	: Kronik İltihaplı Nörolojik, Kütane, Artiküler Sendrom
HIDS	: Hiper IgD Sendromu
NOMID	: Neonatal başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar hastalıktır
DD	: Death Domain / ölüm bölgesi
DED	: Death Effector Domain / ölüm efektör bölgesi
CARD	: Caspase Recruitmend Domain / kaspaz toplayıcı bölgesi
FADD	: Fas adaptor protein with a death domain
DAPIN/PAAD/PYD	: Pirin proteini
LRR	: Lösinden zengin tekrar
NACHT	: Nükleotid bağlanma kıvrımı-oligomerizasyon bölgesi

ÖZET

Çakiris A.

Ailevi Akdeniz Ateşi'ne bağlı inflamatuvar ataklarda ASC,CASP1 ve IL-1B genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2006.

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), otozomal resesif geçiş gösteren ve tekrarlayan akut inflamasyon ataklarına neden olan kalıtsal bir hastalıktır. Hastaların önemli çoğunluğundan 16. kromozomun kısa kolunda bulunan MEFV genindeki mutasyonların sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada AAA hastalığı ile ilişkili MEFV geninin ürünü olan pirin proteininin etkileştiği ASC proteininin 3 adet izoformunun inflamasyon atakları sırasındaki mRNA düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri ve CASP1 geninin 5 adet izoformu ile IL1B geninin 1 adet izoformunun ekspresyonu incelenmiştir. Çalışma grubunu Tel Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı konan 16 hasta, akut appendisit nedeniyle opere olan 17 hasta ve 3 sepsisli hasta oluşturdu. AAA hastalarından ve akut appendisitli hastalardan inflamatuvar ve asemptomatik dönemlerinde kan örnekleri alındı. Toplanmış olan kan örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra cDNA elde edildi ve hedeflenen genlerin ekspresyonları gerçek zamanlı PCR yöntemi ile incelendi. AAA hastalarında CASP1 ekspresyonu akut appendisitli hastalara oranla azalmış bulunmakla beraber, hem hastalarda hem de akut appendisitli kontrollerde, asemptomatik dönem ile inflamasyon dönemleri arasında çok belirgin bir farklılık gözlenmedi. IL1B mRNA düzeyi AAA hastalarına göre kontrollerde artmış bulunmuşsa da, inflamasyon döneminde 2 grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu çalışmada saptadığımız bulguların en çarpıcı olanı, ASC geninin izoform2 varyantının AAA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde asemptomatik dönemde benzer düzeyde eksprese edilmesine rağmen, hem AAA hastalarında hem de kontrollerde inflamasyon döneminde >%98 oranında azalması oldu. Bu bulgu bize ASC geninin 2. transkriptinin inflamasyon kontrolünden öte apoptozda rol alabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlar AAA hastalığında Pirin proteininin ASC ile etkileşimi kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1B inflamasyon kaskadında ve apoptoz yolunda yeni bir homeostatik dengenin oluştuğunu düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçlarının bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi(AAA), Kantitatif polimeraz zincirleme reaksiyonu (QPCR), ASC, Kaspaz-1, IL-1B

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-797/27122005 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Cakiris A.

Analysis the expression of ASC, CASP1 and IL-1B in Familial Mediterranean Fever patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme İstanbul. 2006.

Familial Mediterranean fever (FMF), a hereditary disorder with an autosomal recessive inheritance pattern, is characterized by recurrent self-limited inflammatory attacks at serosal membranes. Most of the patients carry mutations in the MEFV gene in chromosome 16, which encodes the pyrin protein. In this study, we aimed to investigate the expression of the ASC gene with its 3 splice variants, which encodes the ASC protein, through which pyrin protein controls the activity of caspase 1 and proteolytic activation of interleukin-1b (IL-1b). We also analysed the expression of the IL1B and 5 splice variants of the CASP1 genes. The study group consisted of 16 patients with FMF, all fulfilling the Tel-Hashomer criteria, 17 patients with acute appendicitis, who underwent an abdominal surgery because of peritonitis. We collected peripheral blood samples during the acute peritonitis periods from all patients with FMF and acute appendicitis. We also collected samples during asymptomatic period. We isolated total RNA and prepared cDNA from peripheral blood leukocytes. We analysed the expression of the ASC, CASP1 and IL1B genes using real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) method. CASP1 expression was found to be lower in FMF patients compared to the controls with acute appendicitis. However, we could not observe any significant difference between the inflammatory and asymptomatic periods both in patients with FMF and acute appendicitis. We also did not observe any significant difference in the expression of IL1B genes in the inflammation period between the patients with FMF and acute appendicitis. We found a more than 98% decrease of expression in splice variant 2 of the ASC gene during the inflammatory period in both disease groups, although no difference was noted during the asymptomatic period. No similar change of expression was observed in other 2 splice variants of the ASC gene. This study provides new insights about the expression of ASC and CASP1 genes, which might be important in the pathogenesis of FMF. A selective suppression of expression in one of the splice variant of the ASC gene may suggest different roles for 3 isoforms in inflammation and apoptosis pathways

Key Words: Familial Mediterranean fever (FMF), quantitative polymerase chain reaction (QPCR), ASC, Caspase 1, IL1B

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-797/27122005

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), otozomal resesif geçiş gösteren ve tekrarlayan akut inflamasyon ataklarına neden olan kalıtsal bir hastalıktır. Hastalık sıklıkla Doğu Akdeniz bölgesinde yaşayan Yahudilerde, Araplarda, Türklerde ve Ermenilerde görülmektedir. AAA için ülkemizdeki heterozigot taşıyıcılık oranı %10-20 düzeyindedir (1,2,3,4,5).

AAA'da görülen inflamasyon atakları genellikle ateş ile birlikte peritonit, plörit, mono veya oligoartiküler artrit ya da erizipele benzer deri döküntüleri ile karakterizedir (6). Atak sırasında akut faz reaktanlarından özellikle serum amiloid A (SAA), C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen seviyeleri yüksek bulunur (7).

Hastaların önemli çoğunluğundan 16. kromozomun kısa kolunda bulunan MEFV genindeki mutasyonların sorumlu olduğu bilinmektedir. Hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen gen 1992 yılında bu bölgeye haritalanmış olup, sorumlu olduğu düşünülen MEFV geni ve hastalıkla ilişkili mutasyonlar ancak 1997 yılında belirlenebilmiştir (8,9,10,11,12).

AAA gelişiminden sorumlu tutulan gen MEFV (**M**editerranean **F**e**V**er) olarak isimlendirilmektedir. MEFV geninde bu güne kadar 50'den fazla dizi değişikliği/mutasyon saptanmış olup, bunlardan sık görülenler moleküler genetik yöntemler kullanılarak taranabilmekte ve genetik tanı amaçlı kullanılabilir (13,14). Ülkemizden 450 AAA hastasının genetik analizinde M694V, M680I, E148Q, V726A ve M694I mutasyonlarının en sık görülenler olduğu bildirilmiştir. Türk AAA hastalarında görülen mutasyonların % 51.55'i M694V'dir ve farklı toplumlarda bu oran % 40-90 arasında değişebilmektedir (15,16).

AAA'nın moleküler genetiği ile ilgili bilgilerin artmasına karşın, MEFV genindeki mutasyonların hangi mekanizmalarla MEFV geni ve sentezlenen pirin proteinini etkilediği ve inflamasyona yol açtığı tam olarak bilinmemektedir (17,18).

Pirin proteininin sitoplazmada apoptoz ve inflamasyon kontrolünden sorumlu inflamazom kompleksinde görev aldığı gösterilmiştir (19). Bu görevin, amino ucundaki pirin bölgesinin (domain), diğer pirin bölgesi içeren proteinlerle homotipik etkileşimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Pirin proteini, amino ucundaki pirin bölümü ile, bir

adaptör protein olan ASC proteininin pirin bölgesine bağlanır. Bu sayede, ASC proteininin kriyopirin ve diğer proteinlerle etkileşerek kaspaz-1 (CASP1) enzimini aktive etmesini engeller (20). Kaspaz-1 hem interlökin-1 β (IL-1 β) sitokininin proteolitik aktivasyonundan, hem de apoptoz yolunun uyarılmasından sorumludur (21). Bozulmuş pirin fonksiyonunun IL-1 β üzerinden yürüyen inflamasyon kaskadında ve kaspaz-1 üzerinden yürüyen apoptoz yolunda düzensizliklere yol açtığı ve bu durumun AAA patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (22,23).

Yeni tamamlanmış olan bir çalışmada, MEFV geninin ekspresyonundaki azalmanın akut inflamasyona neden olduğunu gösteren veriler elde edilmiştir (24). Elde edilen verilerin ışığında planlanan bu çalışmada da, MEFV geninin ürünü olan pirin proteininin etkileştiği ASC proteininin inflamasyon atakları sırasındaki ekspresyon değişikliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. ASC proteininin oligomerizasyonu CASP1'in uyarılmasına ve bunun sonucunda da IL-1 β 'nin aktive olmasına yol açtığından, eş zamanlı olarak CASP1 ve IL1B genlerinin ekspresyonu da incelenmiştir(17,25).

Çalışmadan elde edilen verilerin AAA hastalığındaki inflamasyon mekanizmalarının anlaşılmasına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ülkemizde hastalığın ve heterozigot taşıyıcıların sıklığı göz önüne alındığında, bu konuda sağlanacak ilerlemelerin toplum sağlığı açısından önemi büyük olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kalıtsal Tekrarlayan Ateş Sendromları (Otoinflamatuvar Hastalıklar)

Kalıtsal tekrarlayan ateş sendromları (herediter periyodik ateş sendromları), önceden belirlenemeyen aralıklarla tekrarlayan ateşli dönemler ve diğer inflamasyon bulguları ile seyreden kalıtsal bir grup hastalıktır. Bu sendromu oluşturan hastalar görünür bir neden olmaksızın başlayan ve tipik olarak ateş epizoduna eşlik eden karın ağrısı, göğüs ağrısı, eklem ağrısı ya da deri döküntüsü ile karşımıza çıkabilmektedir. Ataklar genelde 24-72 saat sürmekte ve ataklar arası dönem asemptomatik seyretmektedir. Atakları başlatan etkenlerin ne olduğu bilinmemektedir. Bununla beraber, ağır egzersiz, yorgunluk ve ruhsal nedenlerle atakların başlayabildiği gözlenmiştir (26).

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) kalıtsal tekrarlayan ateş sendromları arasında en sık görülenidir. Dağılımı etnik ve bölgesel özellikler göstermektedir. Bununla beraber, hastanın klinik bulguları ve genetik kökenlerini gözönüne alarak, daha nadir görülen ve tekrarlayan ateş sendromları ile AAA arasında ayırıcı tanı yapılmalıdır. AAA hastalığına oranla daha yeni tanımlanan diğer otoinflamatuvar hastalıklar da, AAA gibi belirgin amiloidoz riski taşımaktadırlar (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Kalıtsal Tekrarlayan Ateş Sendromları

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)
TNF Reseptörü ile ilişkili Periodik Sendrom (TRAPS)
Mevalonat Kinaz ile ilişkili Periodik Ateş Sendromu (MAPS = hiper İgD Sendromu, HİDS)
Muckle-Wells Sendromu (MWS)
Ailesel Soğuk Ürtikeri (FCU)
Kronik İltihaplı Nörolojik ,Kütane, Artiküler sendrom (CINCA= NOMID)
Blau Sendromu
PAPA Sendromu

Bunlar arasında AAA'dan sonra 2. sıklıkta Tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü ile ilişkili periyodik ateş sendromu (TRAPS) gelmektedir. TNF reseptörü p55'deki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır ve bu mutasyonların p55 reseptörlerinin hücre membranından ayrılmalarındaki azalmaya ve sonuçta doku düzeyinde TNF- α etkinliğinde artmaya neden olduğu düşünülmektedir (27,28).

Hiper IgD sendromu (HIDS); otozomal resesif geçişli, 3-7 gün süren inflamasyon ataklarına neden olan ve mevalonat kinaz enzimi genindeki mutasyonlardan kaynaklanan bir hastalıktır ve bu hastalığın da sonuçta IL-1 β sekresyonunu etkilediği düşünülmektedir (29). Makül, papül, ürtikeryal lezyonlar veya nodüllerden oluşan deri döküntüsü sıktır. Ayırt edici özellikleri lenfadenopati, artmış serum IgD düzeyleri ve ataklar arasında idrarda azalmış mevalonat kinaz düzeylerinin bulunmasıdır (30,31).

Muckle-Wells sendromu; otozomal dominant geçişli, amiloidoz, ilerleyici sensörinöral işitme kaybı ve febril ürtiker atakları ile karakterizedir ve Cold Autoinflammatory Syndrome 1 (CIAS1) genindeki mutasyonlarla oluşmaktadır (32).

Ailesel soğuk otoinflamatuvar sendromu; otozomal dominant geçişli, soğuğa maruz kalma sonrası gelişen ve 1 ya da 2 gün süren ürtiker ile tanımlanır. Burada mutasyon kriyopirin proteinini kodlayan CIAS1 genindedir. Bu hastalıkta da amiloidoz sık görülür.

CIAS1 genindeki mutasyonlarla ilişkili bir diğer hastalık da Kronik İnfanıl Nörolojik Kutanöz Artiküler Sendrom (CINCA) ya da Neonatal başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar hastalıktır (NOMID). Bu sendrom otozomal dominant geçiş gösterir. Bu sendrom, mental gerilik, kronik aseptik menenjit ve işitme kaybına kadar giden nörolojik tablolarla karakterizedir. Artropati belirgindir (33).

2.2 Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)

AAA, otozomal resesif geçiş gösteren, kalıtsal bir otoinflatuar hastalıktır. Hastalık ateş ile birlikte tekrarlayan seroza inflamasyonu (peritonit, sinovit ya da plörit) ataklarına neden olmaktadır.

Literatüre ilk kez 1908’de Janeway ve Rosenthal tarafından bildirilen ve lökositoz, karın ağrısı ve tekrarlayan ateşi olan 16 yaşındaki bir vakayla giren hastalık, 1945’de Siegal tarafından 10 hastadan oluşan bir seri ile ve “Selim Paroksizmal Peritonit“ adıyla tanımlanmıştır. Ardından aynı klinik tablo pek çok şekilde anılsa da, günümüzde yaygın olarak Ailevi Akdeniz Ateşi (Familial Mediterranean Fever-FMF) olarak adlandırılmaktadır (34,35).

AAA semptomları, hastaların %70’inde hayatın ilk on yılında, %90’ında yaşamın ilk yirmi yılında ortaya çıkmaktadır. Ancak ileri yaşlarda başlayan AAA olguları da bildirilmiştir. Hastalığın karakteristik bulguları ateşle birlikte tekrarlayan peritonit, plörit ve artrit ataklarıdır (36). Ataklar genellikle 12-72 saat sürmekte ve spontan olarak gerilemektedir (37,38).

AAA belirgin bir etnik dağılım özelliği göstermektedir. Hastalık Yahudilerde oldukça sıktır. Özellikle Sefarad Yahudilerde AAA sıklığı 1/250-1/1000 arasında değişmektedir. Aşkenazi Yahudilerinde hastalığın sıklığı 1/73,000 olarak bildirilmiştir. Hastalık Türklerde, Ermenilerde ve Araplarda da çok sık görülmektedir. Bu dört etnik grup kadar olmasa da, giderek artan sayıda diğer Akdeniz ülkelerinden de (Yunanistan, İtalya, İspanya) hastalar bildirilmektedir (39).

AAA’ya yol açan gen ilk kez 1997 yılında iki ayrı grup tarafından klonlanmıştır (40,41). Amerika’da National Institute of Health bünyesindeki araştırmacılar (Uluslar arası AAA grubu) ve Fransız AAA grubu (10) eş zamanlı olarak 16. kromozomun kısa kolunda, 10 ekson içeren, 3505 nükleotid uzunluğunda ve 781 aminoasitlik bir proteini kodlayan genin AAA hastalığı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. MEFV geninin kodladığı bu proteine Amerikalı grup, ateş (pyrexia) patogenezindeki rolü nedeniyle “pirin”, Fransız grup ise “marenostin” (Latince Mare Nostrum, -Bizim Deniz- olarak tanımlanan Akdeniz) adını vermişlerdir.

2.3 Ailevi Akdeniz Ateşi 'nde Başlıca Klinik Bulgular

Aşağıdaki semptomlar özgün olmamakla birlikte kuvvetle AAA tanısını desteklemektedir (42).

2.3.1 Ateş

Ateş, hastalığın en tipik bulgularından biridir. Bazı ataklarda ateş tek bulgu olarak karşımıza çıkabilmektedir. Hatta, %2 olguda ataklar yalnızca ateşle seyretmektedir. Ateş hızla 38.5-39 °C'ye çıkıp genellikle 24-48 saat sonra normale dönmektedir. Hastalarda subfebril ateş saptanabileceği gibi, az sayıda olguda ataklar sırasında ateş görülmemektedir.

2.3.2 Karın ağrısı

Hastaların hemen tümünde karın ağrısı olmaktadır. Karın ağrısı AAA'nın en sık ortaya çıkış şeklidir ve olguların ortalama %50'sinde ilk semptom olarak karşımıza çıkmaktadır. Ataklar genellikle 24-48 saat içinde sona ermektedir.

2.3.3 Plevral ve perikardiyal semptomlar

Plevral atak genellikle 48 saat içinde kendini sınırlayan ve hastaların % 25-80'inde görülebilen bir semptomdur. Nefes alıp vermekle batıcı tarzda ağrıya neden olur ve ağrı olan tarafda solunum seslerinde azalma görülür.

2.3.4 Eklem bulguları

Ateşli ataklara eşlik eden sinovyal semptomlar hastaların ortalama %50-75'inde görülmektedir. Eklem bulgularının sıklığı da etnik kökene göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bu semptomların ortaya çıkışı minör travma ya da egzersizle presipite olabilmektedir.

2.3.5 Dermatolojik semptomlar

AAA'da erizipele benzer deri döküntüsü atakları olabilmektedir. Bazen döküntü ve ateş, AAA'nın tek göstergesi olabilmektedir. Döküntü AAA için karakteristik bir bulgu olarak kabul edilmektedir. Genellikle 10 cm büyüklüğünde olan lezyonlar en sık olarak unilateral ya da bilateral olarak bacak ön yüzlerinde görülmektedir.

2.3.6 Kas semptomları

AAA'lı hastaların ortalama % 20'sinde kas ağrıları görülebilmektedir. Kas bulguları, başlıca alt ekstremitelerde, egzersizin presipite ettiği ve birkaç saat ile birkaç gün devam edebilen ve çok şiddetli olmayan ağrı ile karakterizedir.

2.3.7 Amiloidoz

AAA hastalığının bir diğer özelliği, hastaların önemli bir kısmında sekonder (AA tipi) amiloidozu neden olabilmesidir. Amiloidoz gelişme sıklığı etnik farklılık göstermektedir. Türklerde amiloidoz gelişimi diğer etnik gruplara göre oldukça yüksektir. Nefroloji Bilim Dalından bildirilen çalışmalarda amiloidoz gelişimi sıklığı Türklerde %60'lara kadar çıkabilmektedir (43,44).

AAA olan hastalarda genel popülasyona kıyasla inflamatuvar barsak hastalıklarının sıklığında belirgin bir artış gözlenmiştir (45).

2.4 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Patogenezi

AAA otozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Genellikle otozomal dominant geçiş dışlanmakla birlikte taşıyıcı olan olguların çokluğundan dolayı tanımlanmayan yalancı-dominant kalıtım da sıktır (46). AAA bulguları genellikle çocuklukta veya ergenlikte ortaya çıkmaktadır. Hastaların %90'ında 20 yaşına geldiğinde ilk atak gerçekleşmektedir. Hastalar ataklar arası dönemde uzamış artrit olguları dışında asemptomatiktir. AAA'da atakları presipite eden faktörlerin ne olduğu net olarak bilinmemektedir. Ancak atakları uyaran faktörlerin yorgunluk, yoğun fiziksel aktivite ya da emosyonel stresin olabileceği söylenmektedir. Kimi hastada stresle atak provoke olduğundan katekolamin metabolizmasındaki bozuklukların AAA'ya yol açabileceği bildirilmiştir. Bozukluk doğumsal olarak ortaya çıkmakta ve aşırı endojen katekolamin salınımı ile sonuçlanmaktadır. Nitekim AAA'lı bir Japon'un tedavisinde antiadrenerjik bir ajan olan reserpin kullanılmış ve atak şiddetini belirgin derecede azalttığı gösterilmiştir (47).

2.4.1 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Patogenezinde İnflamasyonun Rolü:

AAA patogenezinde, immün aktivasyon/inflamasyon mekanizmalarında kontrol bozukluğu ön plandadır. Öncelikle doğal (innate) immün sistemde bir aksama bulunmakla beraber, edinsel (adaptif) immün sistemin de etkilendiği gözlenmiştir. T hücreleri ve doğal katil (natural killer) hücreleri arasındaki denge bozulmuştur. Supresör T hücre aktivitesinin ve mononükleer hücrelerde kemotaktik aktivitenin azaldığı ve Th1 polarizasyonunun olduğu gösterilmiştir (48). Serozal sıvılarda C5a ve IL-8 inhibitörü eksikliği, poliklonal immunglobulin artışı, supresör T hücre aktivitesinde azalma ve bazı otoantikorların varlığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ataklar sırasında IL-1 ve TNF- α 'nın anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Atak dışı AAA hastalarında normal kontrollere göre artmış bulunan IL-6, IL-8, TNF- α ve dolaşan E-selektin ve L-selektin düzeyleri kolşisin tedavisinden sonra anlamlı derecede azalmıştır. Serumda artmış dolaşan intersellüler adezyon molekülü-1 (sICAM-1) ve IL-8 düzeyleri, lökosit adezyonuna ve dokularda lökosit birikimine neden olabilir. sICAM-1 ve IL-8 atak döneminde yüksek düzeyde bulunur. sICAM-1 düzeyleri, ayrıca remisyonda da yüksek bulunmuştur. Bir çalışmada AAA olan kadın ve erkeklerin IL-1 β düzeyleri anlamlı olarak artmış bulunmuş ve IL-1 β düzeylerinin patogeneizde önemli rolü olduğu vurgulanmıştır. Yine AAA hastaları ve heterozigot taşıyıcılarda fibrinojen düzeyleri yüksek tesbit edilmiş, hastalığın genetik yapısının MEFV taşıyıcılığının göstergesi olabileceği vurgulanmıştır. Hastaların nötrofilleri sıcak ve hipotonisiteye daha çok lizozim salgılayarak yanıt vermekte ve monositlerinin prokoagülan aktivitesi kontrollere göre daha yüksek olabilmektedir. Bu fark endotoksin stimülasyonu ile daha belirgin hale gelmektedir.

Otozomal resesif geçişli olan AAA hastalığına neden olduğu düşünülen gen MEFV, pirin/marenostrin adı verilen ve normal şartlarda inflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan bir proteini kodlamaktadır.

AAA'da inflamasyon ataklarının periyodik olarak gelişmesi proteinin normal şartlarda görevini yerine getirebilirken, stres durumunda yeterli düzeye ulaşamaması ve inflamasyonu kontrol edici görevini yerine getirememesinin hastalık bulgularına neden olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla genetik mutasyonların yanı sıra, çevresel tetikleyicilerin de AAA patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Patogeneizde ileri sürülen en önemli hipotez, pirin/marenostin'in nötrofil aracılı inflamasyonu baskılamasında aksama olmasıdır. MEFV geninde mutasyon oluştuğunda ortaya çıkan fonksiyonel değişiklikler, inflamasyon kontrolünü aksatabilmektedir. Bu durumda, çeşitli nedenlerle uyarılan inflamatuvar reaksiyonlar durdurulamamakta ve ateş ile birlikte, periton, plevra, eklemler ve deri gibi belirli bölgelere sınırlı inflamasyon ataklarıyla klinik tablo ortaya çıkmaktadır.

2.4.2 Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Tanı ve Tedavisi

AAA tanısını koymada klinik semptomlar, aile anamnezi ve laboratuvar-genetik bilgiler birlikte kullanılmaktadır.

AAA klinik tanısında farklı kriterler kullanılmaktadır. Klinik pratikte en sık kullanılan **Tel-Hashomer** kriterleridir. Kesin tanı için 2 major kriter veya 1 major+2 minör kriter; olası tanı için 1 major+1 minör kriter bulunmalıdır (Tablo 2.2).

Tablo 2-2: Tel-Hashomer kriterleri

Kriterler	Klinik bulgular
Major kriterler	Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
	Kolaylaştırıcı bir hastalık olmaksızın AA tipi amiloidoz olması
	Kolşisin tedavisine iyi yanıt
Minör kriterler	Tekrarlayan ateşli ataklar
	Erizipel benzeri eritem
	Birinci derece akrabalarda AAA olması

Ancak AAA'da kesin tanıyı koyabilmek için moleküler düzeyde mutasyon analizlerinin yapılması da mümkündür. AAA lokusundaki mutasyonlar çoğunlukla ekson 10 ve ekson 2'de toplanmıştır. Bugüne kadar 50'den fazla AAA ile ilişkili mutasyon tanımlanmıştır. Bununla birlikte, klinik olarak AAA tanısı konan hastaların yaklaşık %20 kadarında sadece bir mutasyon saptanabilmekte, %5-15 kadarında da MEFV geninde hiç kodlayıcı bölge mutasyonu bulunmamaktadır. Dolayısıyla, AAA hastalığı için genetik heterojenite söz konusu olabilir ve bugün için bütün hastalara sadece moleküler genetik yöntemleri kullanarak kesin tanı koymak mümkün değildir.

Mutasyon analizi farklı şekillerde yapılabilmektedir. Mutasyon analizi için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmaktadır. PCR hızlı ve çok yönlü bir metod olup hedef DNA dizilerinin çoğaltılarak tanımlanmasını sağlamaktadır.

Hastalığın tedavisinde 1972'den bu yana kolşisin kullanılmaktadır (49). Kolşisin, hastalığın bilinen tek tedavisidir.

2.5 MEFV Geni ve Mutasyonlar

16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) 15 kb'lık bir bölgeyi kapsayan MEFV geni 10 ekzondan oluşmakta ve 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu genle ilgili ilk analizlerde klonlanan cDNA'da dört tane hatalı amino asit kodlayan (missense) mutasyon (M680I, M694V, V726A, M694I) tanımlanmıştır. M694I mutasyonunu Fransız AAA konsorsiyumu tarafından dördüncü mutasyon olarak tanımlamıştır. Daha sonra tanımlanan yeni mutasyonlar arasında, 692'de delesyon, K695R, A744S, R761H, ekson 5'de F479L ve ekson 2'de E148Q, E167D, T267I sayılabilir. 2001 yılında ilk kez stop kodon içeren (nonsense) AAA mutasyonu olan Y688X tanımlanmıştır (50,51,52). Bugün hastalıkla ilişkili mutasyon sayısı 50'nin üzerindedir. Tablo 2-3 'de en sık görülen gen mutasyonları gösterilmiştir (53).

Tablo 2-3: MEFV gen mutasyonlarının spektrumu (53)

Eksonlar	Mutasyonlar	Hastalık
Ekson-1 mutasyonları (pirin bölgesi)	R42W, A89T	AAA
Ekson-2 mutasyonları	L110P	AAA
	C390-391ins	Tekrarlayan Eklem Ağrısı
	S141I	AAA
	E148Q	AAA non-spersifik inflamasyon
	E148V, E163A, E167D, S179I, E230K, E251K, T267I, A268V, P283R, P283L, A289V, G304R	AAA
Ekson-3 mutasyonları	E319K, R329H, R354W, P369S	AAA
Ekson-5 mutasyonları	E474K, H478Y, F479L, V487M, R501G	AAA
Ekson-9 mutasyonları	I591T	AAA
Ekson-10 mutasyonları (B30.2 bölgesi)	G632S, I640M, P646L, L649P, R653H, E656A, G678E, M680L, M680I G>C, M680I G>A, T681I, Y688X, ΔI692 2074-6, ΔI692 2074-8, ΔM694, M694V, M694L, M694I, K695R, K695M, V704I, I720M, V726A, A744S, P758S, R761H	AAA

Genin oluşturduğu proteine pirin/marenosterin isimleri verilmiştir. Bu protein daha çok granüositlerde ve aktive monositlerde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Ekson 10'daki M694V, M680I, V726A, M694I, taşıyıcı ve hasta kromozomlardaki mutasyonların %85'ini oluşturmaktadır. Bazı hastalarda bir haplotipte çifte mutasyon görülmektedir. Özellikle İsrailli bazı AAA olan hastalarda, aynı haplotipte V726A ile E148Q mutasyonu birlikte taşınmaktadır.

10. eksondaki M680I, M694V, K695R, V726A, A744S, R761H mutasyonlarıyla I692del mutasyonu konservatif özelliktedir. Daha az konservatif olan E148Q, E167D, T267I, F479L mutasyonları, oluşacak proteinin N ucunun en son kısmını etkiledikleri için iyi tolere edilebilirler, zaten bu bölgede konservatif olmayan ve R202Q adı verilen aminoasit polimorfizmi de bulunmaktadır. Tanımlanan mutasyonların çoğu hatalı kodlamaya neden olan, iki tanesi de okuma çerçevesini değiştirmeyen mutasyonlardır ve bu nedenle oluşan anormal gen ürünüde herhangi bir protein değişimi gözlenmemiştir.

Hastalığa yol açan mutasyonların büyük çoğunluğu pirin proteininin B30.2 bölgesini kodlayan dizide bulunmaktadır (54). Bu bölge, pirin proteininin asıl işlevini gördüğü N-ucundaki pirin bölgesinin tam zıt ucunda olmakla beraber, proteinin işlevinde son derece önemli bir bölge olduğu düşünülmektedir.

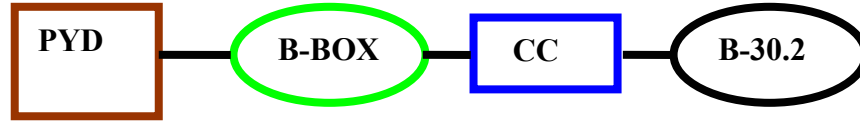
Hastalığa ait değişik klinik bulgular ile ortaya çıkan mutasyonların cinsi arasında çok net bir fenotip/genotip ilişkisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, AAA ve amiloidoz arasındaki ilişkide mutasyonların rolü olduğu düşünülmektedir. Sistemik amiloidozu olan olgularda, en ciddi mutasyon kabul edilen M694V'nin sıklığı artmış bulunmaktadır. Özellikle Yahudilerde M694V mutasyonu sıklığı göreceli olarak artmıştır. Amiloidoz ise bu etnik kökünde daha sık olarak görülmektedir.

MEFV gen mutasyonu ile hastalığın ağır seyri arasında ilişki kurulmuş ve M694V mutasyonu taşıyan bireylerde hastalığın daha ağır seyrettiği görülmüştür. Ancak aynı mutasyonu taşıyan Türklerde, bununla uyumlu olmayan gözlemler de bildirilmiştir. Bu da hastalığın seyrinde bilinmeyen çevresel etmenler ya da etnik kökene bağlı genetik değişikliklerin de rol oynayabileceğini göstermektedir.

MEFV genindeki mutasyonların AAA hastalığına neden olduğunu düşündüren yeterince kanıt bulunsa da, AAA hastalığının kesin patogenezi net olarak açıklanamamıştır. Bu durum hastalıkla ilgili çalışmalar yapılmasına öncülük etmiştir. AAA'nın yaygın olduğu etnik gruplarda en sık görülen mutasyonların hiçbirisi normalden daha kısa bir protein oluşmasına neden olmamaktadır.

2.6 Pirin-Marenostrin Proteini

MEFV geni 16.kromozomun kısa kolunda (16p13.3) 10 ekzondan oluşan 781 aminoasitlik proteini kodlayan bir gen olduğunu biliyoruz. Kodlanan pozitif yüklü proteine marenostrin/ pirin , isimleri verilmektedir.Pirin proteini özellikle nötrofillerde ve uyarılmış monositlerde eksprese olmaktadır ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. İnterferon-gama (IFN- γ) ve TNF gibi inflamatuvar medyatörler genin eksprese olmasını artırabilmektedir (55,56). MEFV geninin sadece miyeloid hücre dizilerinde değil kas, akciğer, dalak, kolon ve prostatta da eksprese olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Pirin proteininin bölgeleri (domain)

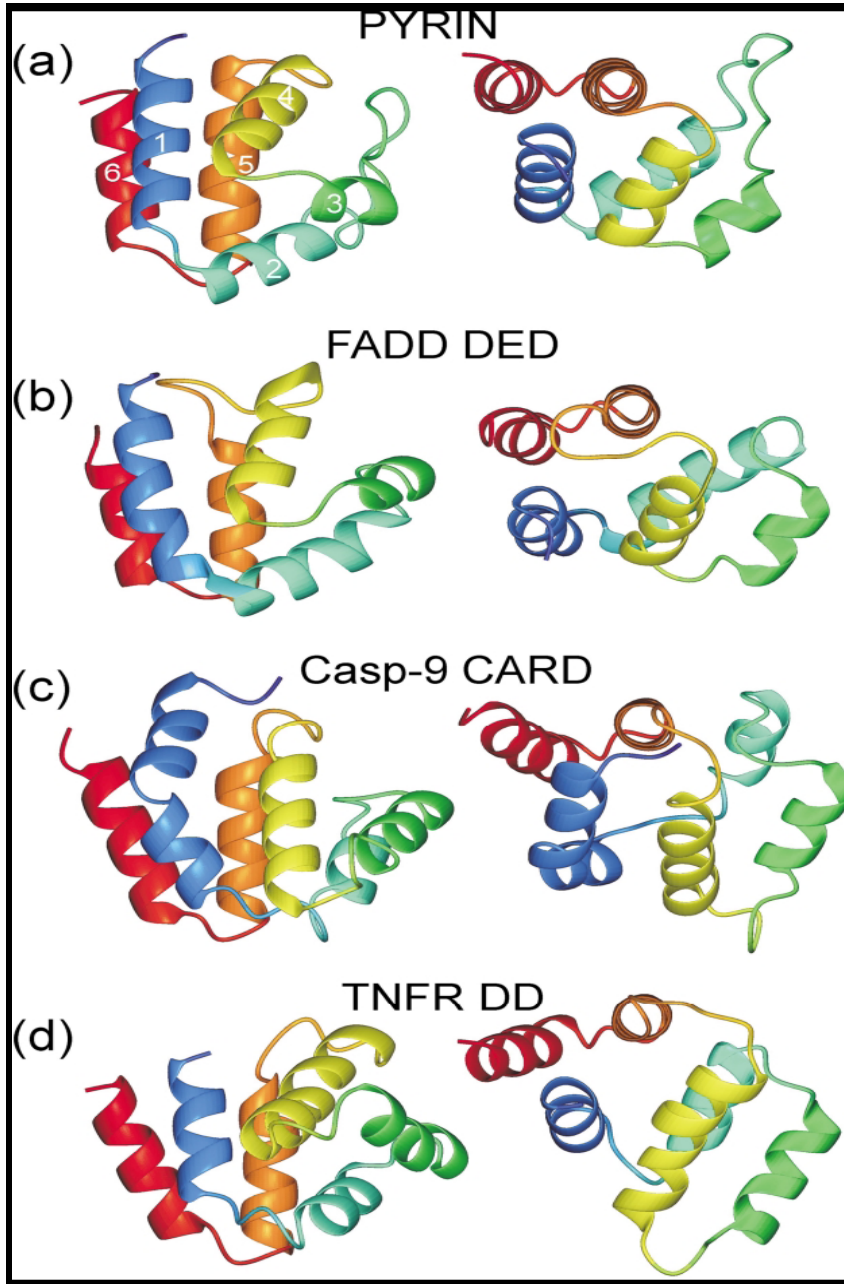
Pirin proteini 4 bölgeden oluşur: N-terminal ucunda PYD/DAPIN/PAAD bölgesi, B-Box, Coiled coil ve C-terminal ucunda B.30.2/rfp/SPRY bölgesi bulunur.(Şekil 2-1) Proteinin amino ucunda yer alan 92 aminoasitlik bölge ilk kez pirin proteini ile tanımlanmış ve özellikle apoptozda görev alan ölüm/apoptoz bölgesi (DD), ölüm efektör bölgesi (DED) ve kaspaz toplayıcı bölgesi (CARD) ile benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Bu protein bölümü de PYD olarak adlandırılmaktadır. Bu bölüm diğer inflamazom proteinleri ile etkileşimde ve apoptozda, dolayısıyla proteinin fonksiyonlarında anahtar rol oynar. B-Box ve CC (Coiled Coil) bölgelerinin yapı ve fonksiyonları şimdilik bilinmemektedir.

Pirin bölgesinin DD süper ailesinin bir üyesi olduğu anlaşılmıştır. Pirin bölgesinin yapısı klasik DD kıvrımlarına göre düzenlenmiş 6 alfa heliksten oluşmuştur (57,58,59). DD içeren proteinler apoptoz ve inflamatuvar yanıttan sorumlu olan proteinlerdir. CARD ve DED ailesi proteinleri interselüler sistein proteazlar olan kaspazların aktivasyonunda yer alırlar (22). DD süper ailesine ait 6 heliksten oluşmuş proteinler, helikslerin arasında spiral yapan bölgelerinin ve helikslerinin uzunlukları bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedirler. Bu farkın protein fonksiyonları üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Farklı DD alt gruplarından olan bölgeler birbirlerini etkileme eğilimindedirler. Biyolojik önemleriyle orantılı olarak, self asosiyasyonlarına bağlı olan zayıf çözünürlüklerine rağmen DD, DED ve CARD içeren bir çok yapı tanımlanmıştır (60,61,62).

Protein Data Bank (PDB) daki araştırmaya göre Pirin bölgesine yapısal olarak en çok benzeyen proteinler DED, DD içeren Fas adaptör proteini (FADD), onu takiben CARD protein grubuna ait prokaspaz-9 ve TNF reseptörü (TNFR) DD bölgesidir (Şekil 2-2).

Pirin proteininin karboksi ucuna yakın bölgedeki B30.2 bölümü, en çok mutasyonun saptandığı yerdir ve pirin fonksiyonlarını tanımlamak için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. B30.2 bölümü ile pirin, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve Sjögren sendromunda otoantijen olarak tanımlanmış, bir ribonükleoprotein olan “Ro52/SSA” Ro-Ret protein ailesine benzerlik göstermektedir. Ayrıca pirin/marenostrin proteinin bilinen iki antiinflamatuvar proteinle de analog olduğu görülmektedir. Bunlar rpt1 (regulatory protein lymphocyte 1) ve staff 50 proteinleridir (63). Yapılan homoloji araştırmaları pirinin nükleer lokalizasyon sinyallerine de sahip olduğunu göstermiştir.

Pirin (PYD) bölgesi içeren proteinlerin bir kısmının ekspresyonu sürekli olabilir (PAN2 ASC), bazıları da direkt olarak konağın savunmasında görev alan hücrelerde üretilir (makrofajlar, nötrofiller, lenfositler). Pirin ekspresyonun modüle eden uyarılar henüz tam olarak bilinmemekle beraber, inflamatuvar sitokinler ve LPS’in etkisinin olabileceği düşünülmektedir. LPS ve TNF- α gibi inflamatuvar mediatörler kriyopirinin ekspresyonunu regüle ederler. Bunun sonucunda da inflamasyon bölgelerinde de kriyopirin ekspresyonu artar (64).



Şekil 2-2: Pirin, DED, CARD ve DD bölgelerinin yapısal karşılaştırması (20)

- a) ASC'ın PYD (pirin) bölgesi 6 heliks ile numaralandırılmıştır.
- b) FADD'ın DED bölgesi
- c) Kaspaz-9'un CARD bölgesi
- d) TNFR'nin DD bölgesi

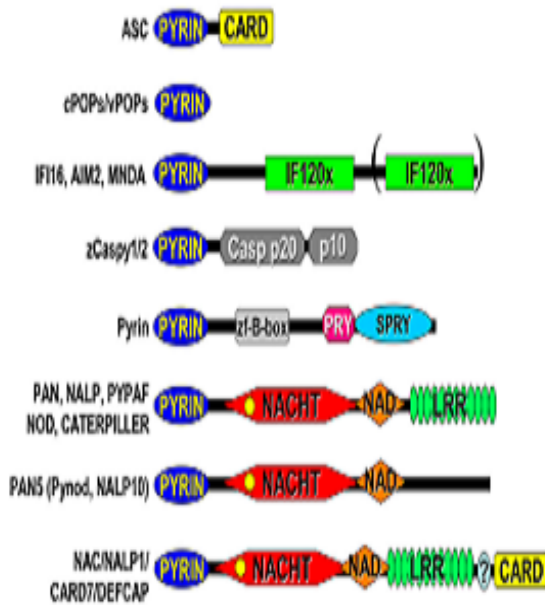
2.6.1 Kriyopirin Proteini

Pirin bölgesi ile ilişkili olan başka bir protein de kriyopirindir. Ailesel soğuk otoinflamatuar sendromundan sorumlu CIAS-1 geninin ürünü olan Kriyopirin, PYD ve NACHT bölgeleri içeren (PAN) ailesi proteinlerinin bir üyesidir. İnsanda bu aileye giren proteinlerin sayısı 15'dir (Şekil 2-3).

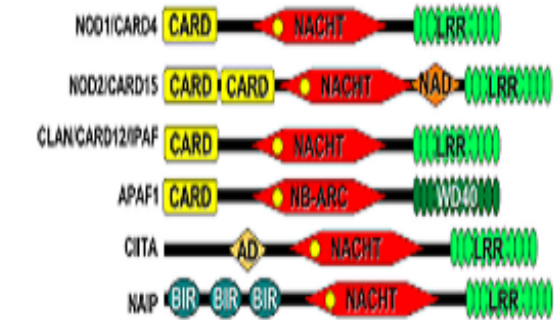
Bu proteinler 3 bölgenin karakteristik kombinasyonlarını içerirler. Bunlar PYD (pirin) bölgesi, spesifik bir nükleotid bağlanma kıvrımı-oligomerizasyon (NACHT) bölgesi ve birçok birbiri ardına olan kopyadan oluşan lösinden zengin tekrar (LRR) bölgeleridir (65,66).

NACHT bölgesini içeren 20 farklı protein içerisinde, inflammatuar hastalıklarla ilişkili kalıtsal mutasyonlar NOD2 geninde de belirlenmiştir. NOD2 geni de kriyopirin ile benzer yapıda bir protein sentezler. Aralarındaki tek fark kriyopirindeki PYD bölgesi yerine bir çift CARD bulunmasıdır. NOD2 genindeki mutasyonların Crohn hastalığı ve Blau sendromu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (67).

A Pirin ailesi proteinleri



B İlişkili proteinler



C Bitki proteinleri



D Toll-like reseptör



Şekil 2-3: Pirin Bölgesi ve ilişkili olduğu proteinler (68)

2.7 Apoptoz ve İnflamasyon Mekanizması

Apoptoz yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (69).

Apoptoz rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücresel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Apoptozun artması nörodejeneratif hastalıklara ve AIDS’de görülen lenfosit yetersizliğine, azalması ise malignite ve otoimmün hastalıklara yol açabilir (70,71).

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar; apoptozun başlatılması, hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması ve fagositoz olarak özetlenebilir (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Apoptoz Basamakları

Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller, kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler.

2.8 Kaspazların Yapısı ve Sınıflandırması

Kaspazlar (sistein içeren, aspartata-özü proteazlar,/cysteine-containing aspartate-specific proteases-caspase) kalsiyumdan-bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluşturlar (72). Apoptozun son devresindeki hücrel substratların degradasyonundan sorumlu olduğu gibi, apoptozun başlatılmasında da kritik önemleri vardır. Bunlar tetrapeptid motifleri tanırlar ve substratlarını bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından parçalarlar.

Apoptozun gerçek anlamda tam olarak mekanizması anlaşılamamasına rağmen apoptoz ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur (73,74). Günümüze kadar insan ve farelerde 14 kaspaz tanımlanmış ve bunların 11 ayrı fonksiyonu gösterilmiştir. Kaspaz 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 14 hem farelerde hem insanlarda bulunurken, kaspaz 4 ve 5 sadece insanlarda, kaspaz 11 ve 12 ise sadece farelerde bulunmaktadır. Kaspaz 12'ye ait dizi insanlarda tanımlanmıştır, ancak bu dizi aktif enzim kodlamamaktadır (Tablo 2-4).

Tablo 2-4: Belli başlı kaspazlar

Kaspaz-1 (ICE)
Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICE _{re_u})
Kaspaz-5 (ICE _{rel_{iii}} , TY)
Kaspaz-6 (Mch2)
Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
Kaspaz-10 (Mch4)
Kaspaz-11 (ICH-3)
Kaspaz-12
Kaspaz-13 (ERICE)
Kaspaz-14 (MICE)

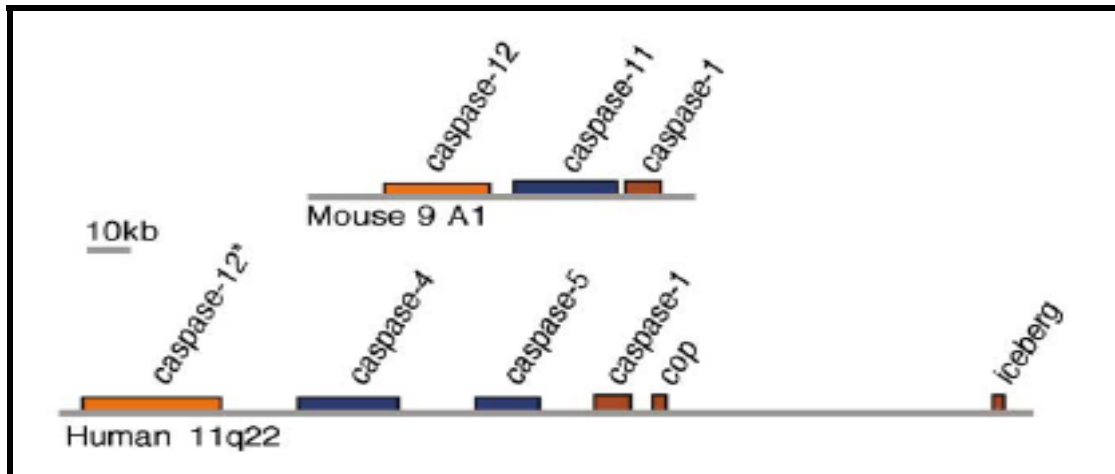
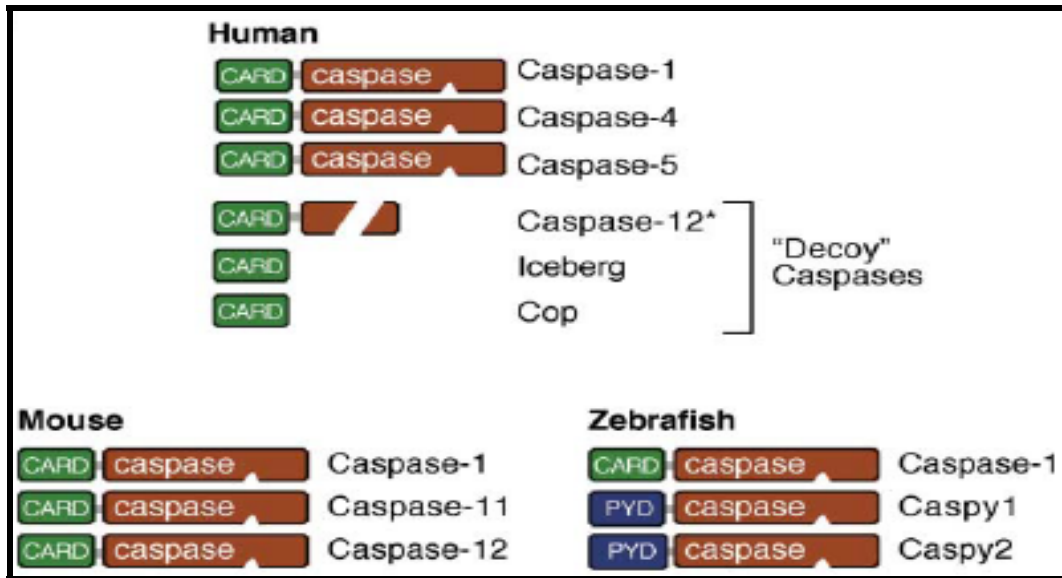
Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre sitokin aktivasyonu yapanlar (inflamatuvar grup), apoptozu başlatanlar (başlatıcı-inisiyatör grup) ve apoptozu yürütenler (efektör grup) olarak 3 ana grupta incelenmektedir (Tablo 2-5).

Tablo 2-5: Kaspazların sınıflandırılması

Başlatıcı Kaspazlar	Efektör Kaspazlar	Sitokin Aktivasyonu Yapanlar	
Casp-2	Casp-3	Casp-1	Casp-12
Casp-9	Casp-6	Casp-4	Casp-13
Casp-10	Casp-7	Casp-5	Casp-14
Casp-8		Casp-11	

İnsan kaspazlarında kaspaz 1, 4, 5 ve fare kaspazlarında 11 ve 12 birlikte kaspaz-1 alt grubunu oluştururlar. Kaspaz-1 alt grubu öncelikle keratinosit diferansiyasyonunda, ayrıca stresle indüklenen apoptozda görev alır. Tüm kaspazlar N-terminal ucunda CARD bölgesi taşırlar. Ancak zebra balığında inflamatuvar kaspazların, N-Terminal bölgesi farklı iki alt grubu tanımlanmıştır: Caspy 1 ve Caspy 2 N-terminalde pirin bölgesi içerirken, üçüncü kaspaz CARD bölgesi içermektedir.

Memelilerde 5 tane inflamatuvar kaspaz bulunur ve hepsinin N-terminal ucunda CARD bölgesi bulunmaktadır. 11. kromozomda telomere yakın yerden kaspaz 1, 5, 4 ve 12 olarak kodlanmaktadır. Farede dizilim benzer olmakla birlikte kaspaz 11, kaspaz 4 ve 5 ile yer değiştirmiştir. İnsanlarda aynı lokusta 2 tane kaspaz 1 inhibitörü ICEBERG ve COP (pseudo-ICE) bulunmaktadır (75,76). Bu yapıların da bir tane CARD bölgesi olmakla birlikte, mürin lokusundan yoksundurlar (Şekil 2-5).

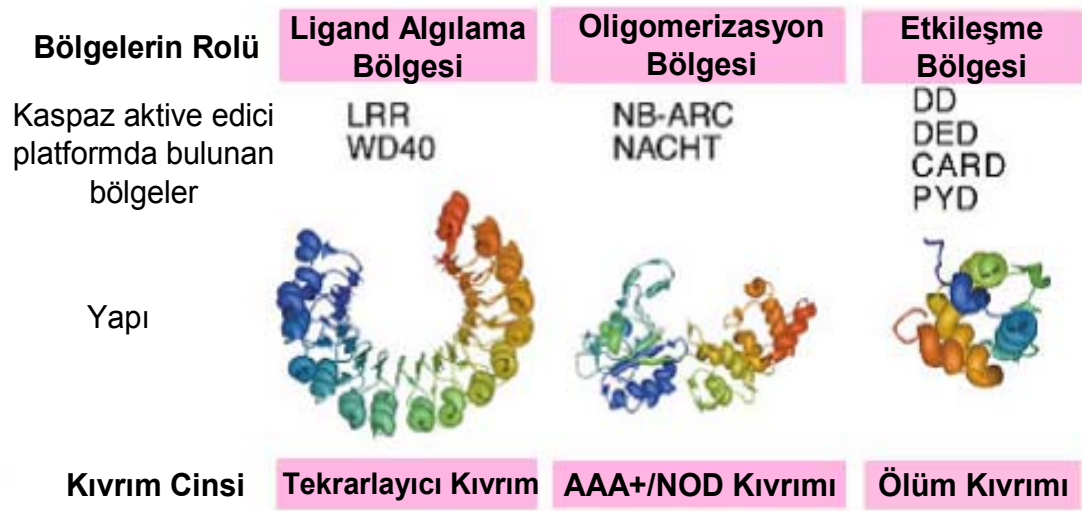


Şekil 2-5: İnflamatuar kaspazlar (77)

2.8.1 Kaspazların Aktivasyonu ve Kaspaz Aktive Edici Platform

Kaspazlar hücre içinde inaktif monomerler (zimojen form) şeklinde bulunurlar. Monomerik inaktif prekürsörler dimerizasyon (oligomerizasyon) ile aktif hale geçer. Ayrıca başlatıcı kaspazların yapımı aktif enzimin stabilizasyonunda rol oynar (78). Başlatıcı kaspazların dimerizasyonu multipl kaspaz moleküllerin katıldığı bir kompleks şeklinde gerçekleşmektedir.

Kaspaz aktive edici moleküller yapısal olarak 3 bölümden oluşmaktadırlar. (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Kaspaz aktive edici moleküllerin yapısı (77)

1- Kaspaz aktive edici moleküller başlatıcı kaspazların öncü-bölgesi (pro-domain) ile etkileşen bir bölge içerirler. Başlatıcı kaspazların öncü-bölgesi ölüm kıvrımı (death-fold/DF) ailesinden olduğu için, aktive edici moleküllerde de DF bölgesi bulunmalıdır. DF ailesi 4 bölge içermektedir. Bu bölgeler DD, DED, CARD ve PYD bölgeleridir (79).

2- Kaspaz aktive edici platformun ikinci özelliği oligomerizasyon ya da dimerizasyona uygun bir yapı içermesidir. Bu yapılar NACHT ya da NB-ARC bölgeleridir ve kaspaz aktive edici sistemde oligomerizasyondan sorumlu motiflerdir. Her iki bölge de nükleotidleri bağladıkları için nükleotid bağlanma bölgeleri (NBS) ya da nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon bölgeleri (NOD) olarak adlandırılırlar.

3- Kaspaz aktive edici platformda üçüncü önemli yapı, aktiviteyi regüle eden bölgedir. Kaspaz aktive edici platform sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunur ve sadece spesifik bir sinyal varlığında, ligandın bağlanması ve oligomerizasyonunu takiben aktivasyonu gerçekleşir. Aktive edici sinyal yokluğunda platform inaktif bir yapıda kalır. Liganda duyarlı bölgeler, LRR ya da Apaf1'deki WD40 bölgeleridir.

En iyi tanımlanmış kaspaz aktive edici platform Apaf 1 içeren apoptozomdur. Apoptoz, ya Fas/FADD/kaspaz-8 yolundan, ya da Apaf-1–kaspaz 9 yolundan gerçekleşir (80).

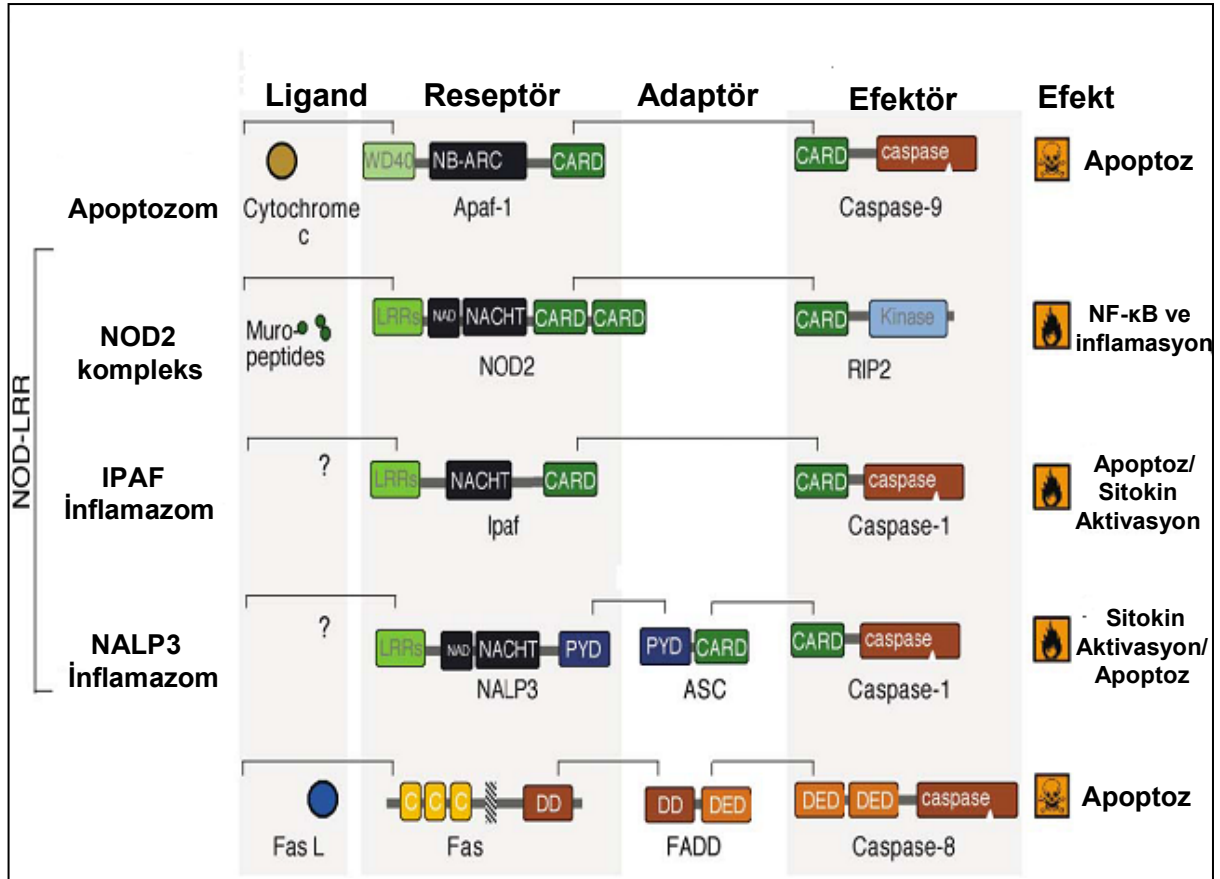
2.8.2 Kaspaz -1'in Aktivasyonunu Sağlayan NOD-LRR Ailesi Üyeleri

NOD-LRR ailesi, diğer isimleri ile CATERPILLAR, PAN, PYPAF kaspaz aktive edici platformun tüm özelliklerini taşıyan bir ailedir. Kendi içinde CIITA, NOD, Ipaf ve NALP alt gruplarına ayrılır (81).

NOD-LRR proteinleri yapısal olarak Apaf-1 ile homologdur. NOD-LRR ailesinin üyeleri kaspaz etkileşimi için CARD ya da PYD bölgesine sahiptir. Oligomerizasyon bölgesi olarak da tipik olarak NACHT bölgesi içerir. Ligand duyarlı bölgeleri de LRR üzerindedir. Patojenlere ait molekülleri tanıma işlevi NOD-LRR ailesinin hafızası ile yapılmaktadır. NOD-LRR ailesinin 2 alt grubu olan NOD1 ve NOD2 bakteriyel muropeptidlerin tanınmasını sağlar. NOD1 ve NOD2'nin ekspresyon fazlalığı NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu etkileşim CARD bölgesi üzerinden gerçekleşir. Muropeptidler, NOD2'nin LRR bölgesine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda NOD2'nin CARD bölgesi RIP2'nin CARD bölgesine bağlanır, RIP2 aktive olur ve ardından NF- κ B aktivasyonu gerçekleşir (82) (Şekil 2-7).

NOD-LRR ailesinin iki üyesi olan Ipaf ve NALP inflamatuvar kaspazların aktivasyonunda rol oynarlar. NALP proteinleri kaspaz 1 aktivasyonunda ve kaspaz 5 aktivasyonunda rol almaktadır. NALP1, NALP2, NALP3 (kriyopirin ve PYPAF1 olarak da biliniyor), NALP6 (PYPAF5), NALP12 (PYPAF7) proteinleri ASC'ye bağlanarak kaspaz 1'in aktivasyonunu sağlarlar (83). Ipaf fonksiyonel olarak kaspaz 1'i aktive eder ve ekspresyonunu artırır. Kısacası Ipaf kaspaz 1 aktive edici protein olarak tanımlanabilir (84).

Ipaf proteininin uyarımı bilinmemektedir. Ancak LRR uyarımı algılandığında Ipaf'ın CARD bölgesi kaspaz 1'in CARD bölgesi ile etkileşerek aktif hale gelmesini sağlar; bunun sonucunda apoptoz ve sitokin aktivasyonu gerçekleşir. NALP3 proteininin de uyarımları tam olarak bilinmemektedir. Yeni yayınlanan 3 makale ürik asit, bakteri RNA'sı, ATP ve flagellin ile kriyopirinin uyarılabildiğini göstermiştir (85,86,87). Ligand sensör bölgesi LRR uyarım algılandığında NALP3'ün PYD bölgesi, ASC'nin PYD bölgesi ile etkileşir. Bu etkileşim sonucunda ASC'nin CARD bölgesi kaspaz 1'in CARD bölgesine bağlanarak aktif hale gelmesini sağlar; sonuçta, sitokin aktivasyonu ve apoptoz gerçekleşir.



Şekil 2-7: Kaspaz aktivasyon paltformu (77)

2.8.3 İnflamasyonda CASP1 (ICE / IL-1 β Dönüştürücü Enzim)'in Yeri ve Önemi

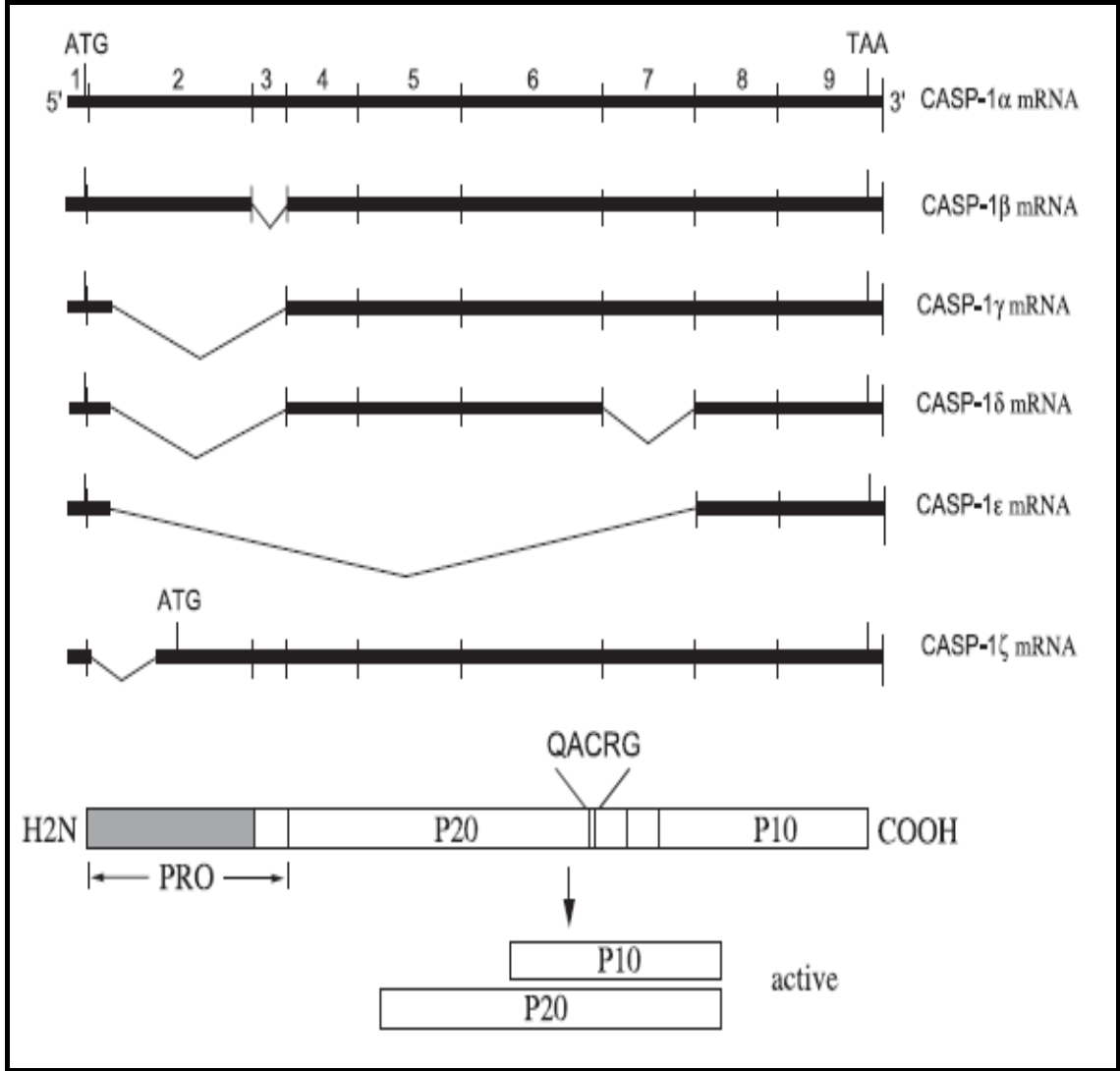
Birçok kaspaz apoptozun indüklenmesiyle ilgili olsa da, bu ailenin üyelerinden bazıları CASP1 diğer adıyla IL-1-dönüştürücü enzim (IL-1 β converting enzyme-ICE), IL-1 β ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin proteolitik işlenmesinden ve aktivasyonundan sorumludur.

CASP1 (ICE) memeli hücrelerinde bulunan ilk kaspaz olmasının yanı sıra inflamasyonda önemli rol oynayan bir sitokin olan pro IL-1 β 'nın 31-kDa'luk inaktif formunu, 17-kDa'luk aktif forma dönüştürmesiyle de iyi bilinmektedir (88). CASP1 apoptotik sürecin temel komponentlerinden biri olmasa bile birçok sistemde apoptoza sebep olduğu bildirilmiştir. Örnek olarak kaspaz 1'in ekspresyonu fibroblastlarda apoptoza neden olur ve bakteriyle infekte olmuş makrofajların apoptozu için de kaspaz-1 gereklidir (89,90).

Başka çalışmalar da Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezindeki proapoptotik rolünü açıklamaktadır.

CASP1, 11q22–q23 kromozomunda lokalize olmuştur. CASP1 10 eksona sahiptir ve en az 10.6 kb'lik bir bölgeyi kapsar (91).

CASP1 temel olarak hücrelerin sitoplazmalarında 45-kDa'luk proformu ile mevcuttur. Aktivasyondan önce prokaspaz-1 küçük fonksiyonel fragmentlere parçalanır. Aktif CASP1 iki geniş p20 ve iki küçük p10 alt ünitelerinden oluşur (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Kaspaz-1 mRNA izoformları (93)

Dolgun barlar 9 adet eksonu, ince çizgilerde kesim bölgelerini göstermektedir.

PRO: Pro-domain, öncü-bölge içindeki gri bölge de CARD'ı göstermektedir

CASP1 geninin alternatif kesimi sonucunda 5 adet transkript varyantı oluşmuştur. Bunlar α , β , γ , δ ve ϵ izoformlarıdır. CASP-1 α ICE ve IL-1 β prekürsörünü ayırır. CASP1 β ve γ 'nın da aynı işlevi gördüğü sanılmaktadır. CASP-1 ϵ ICE'nin kesilmiş formunu oluşturmaktadır. p20 zincirine bağlanarak CASP-1'in aktivitesini engellemektedir. Ayrıca α , β , γ izoformları apoptoz oluştururlar, izoform δ 'nın apoptotik bir etkisi yoktur. İzoform ϵ de hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlar (92).

Önceleri tanımlanmış olan bu 5 alternatif kesim varyantından sonra CASP-1 ζ adında CASP1'in yeni bir izoformu tanımlanmıştır. Yeni izoform ζ , α izoformu ile aynıdır. Aralarındaki tek fark bu yeni izoformun prokaspaz-1'in öncü-bölge kodlama bölgesinde 79 nükleotitik bir eksik bulunmasıdır. Yeni oluşan protein Prokaspaz-1 α 'nın N- terminalindeki CARD bölgesinden 39 aminoasit eksiktir (93).

QACRG pentapeptidini içeren ve CASP1'in aktif bölümünü oluşturan Cys 285 p20'nin karboksi ucuna yakın lokalize olmuştur. Prokaspaz-1'in ana kısmını CARD oluşturur. Öncü-bölgeler kaspazların önemli bir kısmını oluşturur. Prokaspazlar bu bölümden kesilerek aktive olurlar. Kaspaz-1'in öncü-bölgesinin diğer CARD taşıyan proteinlerle bağlanarak inflamasyon gibi biyolojik işlevlerde de anahtar rolü oynadığı düşünülmektedir (Şekil 2-8).

2.8.4 CASP1'in İmmün yanıtındaki rolü

C. elegans'daki Ced-3'ün memelilerdeki karşılığının CASP1'in olduğunun anlaşılması ve bu iki genin fazla ekspresyonunun apoptozu teşvik etmesi, CASP1'e yönelik araştırmaları artırmıştır.

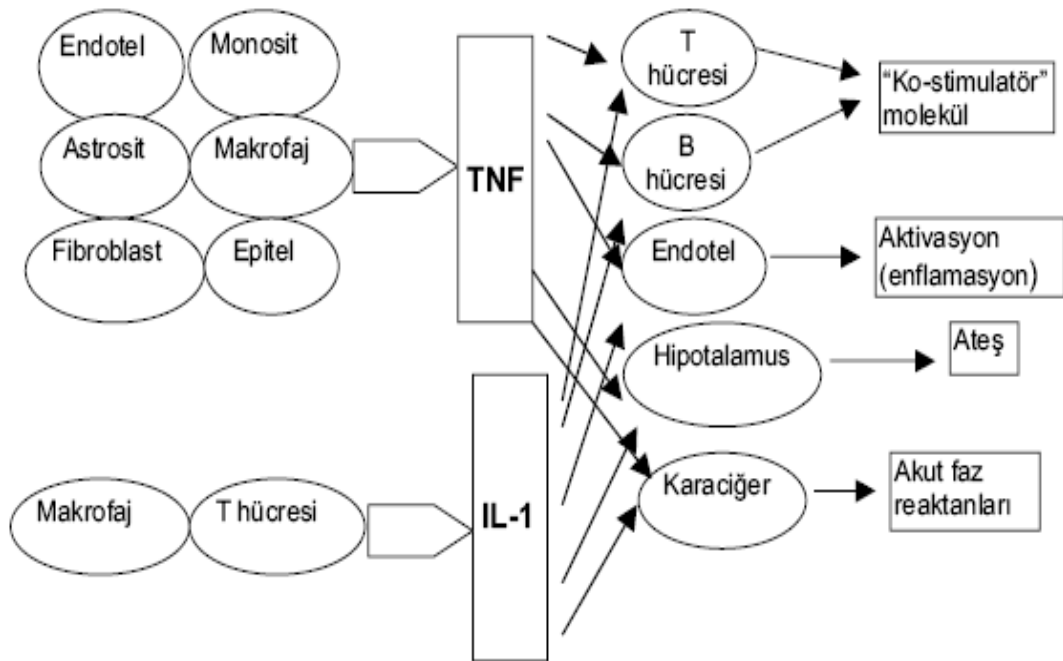
CASP1 kaspaz gen ailesinin genetik olarak inaktive edilmiş ilk üyesidir. Yapılan knock-out çalışmaları bize CASP1'in immün yanıt regülasyonundaki rolünün önemini aynı zamanda da, bütün apoptotik yollarda da görev almadığını kanıtlamıştır (94). CASP1^{-/-} farelerde olgun IL-1 β oluşumu tespit edilememiştir. Ayrıca IL-1 α , IL-6, TNF- α ve IFN- γ üretiminde de bozukluklar göze çarpmaktadır. CASP1^{-/-} farelerin makrofajlarında LPS-indüklenmiş IFN- γ üretiminde bozukluklar vardır ve bunlar endotoksinlerin letal efektlerine karşı yüksek derecede direnç gösterirler (95). Kaspaz-1'in farmakolojik blokajı ya da delesyonu ile nekroz, ödem oluşumu ve deneysel olarak indüklenmiş pankreatitte lipaz ve amilaz serum düzeylerinde artış görülmektedir. Bu da bize CASP1'in proinflamatuvar rolünü kanıtlamaktadır (96).

2.9 Sitokinler

İmmün sistemin hormonları olarak da tanımlanabilecek olan sitokinler çeşitli uyarıların etkisi ile immün ve non-immün hücrelerden sentezlenir ve hedef hücre davranışını etkiler. Yerel veya uzak etkileri olabilir. Glukoprotein yapısındaki bu mediatörlerden immün hücreler arası stimülatör veya inhibitör uyarılar taşıyanlar interlökinler, lökosit kemotaksisini tetikleyenler kemokinler olarak adlandırılırlar (97). Nonspesifik immüniteyi ve inflamasyonu artıranlar (proinflamatuvar sitokinler): IL-1, IL-6, IL-8, IFN- α , IL-15, TNF ve IFN- γ 'dır.

Proinflamatuvar sitokinler içinde TNF ve IL-1 sitokin kaskadındaki çok önemli rolleri nedeniyle proinflamatuvar orkestra şefleri olarak tanımlanabilirler (Şekil 2-9).

IL-1 in biyolojik etkileri TNF ile benzerdir ve serbestleşen sitokin miktarına bağlıdır. Düşük yoğunlukta bölgesel inflamatuvar olaylara aracılık eder. IL-1 daha yüksek miktarlarda salgılandığında, kan dolaşımına girer ve endokrin etkiler gösterir. Sistemik IL-1, TNF ile birlikte ateşin oluşumuna neden olur. Karaciğer tarafından akut faz proteinlerinin sentezini artırır ve metabolik zayıflamanın başlamasına neden olur (98).



Şekil 2-9: İnterlökin 1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α)

2.9.1 IL-1 Süper Ailesi ve IL-1 β

IL-1 timosit yanıtını yükseltgeyen, poliklonal aktivatör olarak mononükleer fagositlerden türeyen bir polipeptiddir. IL-1 ve onunla ilişkili IL-18 otoimmün hastalıklar ve inflammasyonla ilişkili genlerin uyarılmasından sorumludur (99).

IL-1 α ve IL-1 β mononükleer fagositlerden salınırlar. İki IL-1 proteini iki farklı genin ürünüdür. Fakat her ikisi de hücre dışında benzer biyolojik aktiviteleri olan ve hedef hücrelerde aynı membran reseptörünü aktive eden sitokinlerdir. IL-1 β , vücudun, mikrobiyal invazyona, inflamasyona, immunolojik reaksiyonlara verdiği yanıtta anahtar rol oynayan ve özellikle in vivo ateş yanıtının oluşmasında önemli olan bir sitokindir. Patojenik infeksiyonların kontrol altına alınmasında her ne kadar IL-1 β kritik bir role sahip olsa da, aşırı sitokin salgılanması, konağa zarar verebilir, hatta fatal olabilir. Bu nedenle sitokin salınımı her aşamada; gen ekspresyonu, sentezi, sekresyonu ve reseptör duyarlılığı aşamalarında kontrol edilmektedir. IL-1 β mRNA'sı ekstrasellüler sinyallere maruz kalan hücrelerde bulunmamaktadır. Değişik inflammatuar uyaranlar; endotoksinler, TNF ya da forbol ester (PMA) IL-1 β sentezini indüklerler. Transkripsiyon faktörü NF- κ B IL-1 β sentezinde önemli rol oynar. IL-6, CSF ve kemokinler gibi sekonder sitokinlerin indüksiyonunda in vivo ve in vitro çalışmalarda IL-1 β 'nın rolü olduğu gösterilmiştir (98,100,101).

Bugüne kadar IL-1 süperailesinin 10 üyesi tanımlanmıştır (Tablo 2-6). Bunların sadece 4'ü etraflıca çalışılmıştır. Diğer altısının farklı insan dokularında varlığı kanıtlanmıştır, fakat bunların rolleri tam olarak bilinmemektedir. IL-1 gen ailesinin öncül bu 4 üyesi IL-1 α , IL 1 β , IL-18 ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra)'dir (102,103).

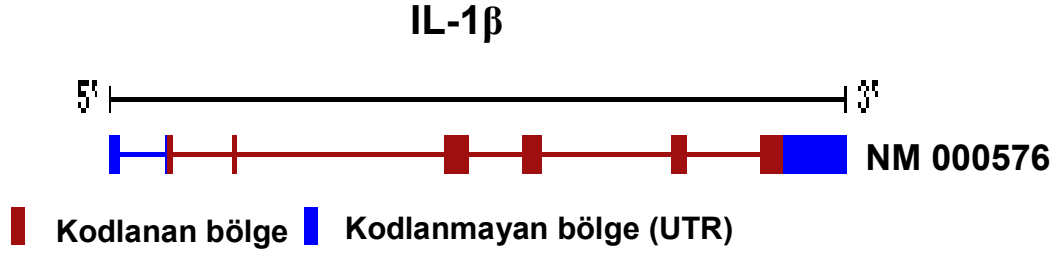
Tablo 2-6: IL-1 süperaillesinin üyeleri

Yeni isim	Eski isim	Özellikler
IL-1F1	IL-1 α	Agonist
IL-1F2	IL-1 β	Agonist
IL-1F3	IL-1Ra	Antagonist
IL-1F4	IL-18;IFN γ indükleyici faktör	Agonist
IL-1F5	IL-1Hy1, FIL1 δ , IL-1H ζ , IL-1RP ζ , IL-1H4, IL-1RP1	Bilinmiyor
IL-1F6	FIL-1, IL-1 ϵ	Bilinmiyor
IL-1F7	FIL-1 ζ , IL-1H4, IL-1RP1	Bilinmiyor
IL-1F8	FIL-1h, IL-1H2	Bilinmiyor
IL-1F9	IL-1H1, IL-1RP2	Bilinmiyor
IL-1F10	IL-1Hy2, FKSG75	Bilinmiyor

IL-1 α , IL 1 β ve IL-18'in her biri başlangıçta sinyal peptidi içermeyen öncül bir molekül olarak sentezlenmişlerdir. Amino ucundaki amino asitlerinin spesifik proteazlarla kesimi sonucunda aktif formlarını oluşturmuşlardır. IL 1 β 'nın 31 kDa'luk öncül formu ve IL-18'in 24 kDa'luk formu biyolojik olarak inaktiftir ve aktif hale gelebilmesi için kaspaz-1 (ICE) sistein proteazıyla kesilmesi gerekmektedir. Bu kesimin sonucunda da IL 1 β 'nın 17,5 kDa'luk aktif formu ve IL- 18'in 18 kDa'luk aktif formu meydana gelir (104,105).

IL-1 β 'nın aktifleşmesi iki yolla meydana gelir. Bunlardan birincisi NF- κ B yolu üzerinden gerçekleşmektedir ve sonuçta mRNA sentezi ve pro-IL-1 β 'miktarı artar. İkinci yol da adaptör proteinlerin üzerinden işleyen yoldur. Bu yol inflamazom kompleksinin ATP ya da diğer uyarıcıları ile inflamasyon komponentlerinden olan ASC'ı aktifleştirmesi, ASC'ın kaspaz 1'in aktif formunu meydana getirmesiyle devam eder. Kaspaz 1 de IL-1 β 'yı aktifleştirerek inflamasyonun oluşmasını sağlar (77).

IL-1 süperaillesinin birçok üyesi 2. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. IL-18 ve IL-18 bağlayıcı protein (IL-18BP) kromozom 11 de lokalizedir. IL-1 β geni 2q14' de lokalizedir, 6 ekson ve 5 introndan oluşmuştur (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: IL-1 β geni (106)

IL-1 β knock-out fareler bu geni taşıyan farelere göre spesifik farklılıklar göstermişlerdir. Bu çalışmalarda IL-1 β 'in lokal inflamasyon sırasında ateşin indüklenmesinde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (107).

2.10 ASC'nin Fonksiyonu ve Moleküler Yapısı

ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) nötrofillerde inflamasyonu ve apoptozu regüle etmek üzere eksprese edilen adaptör bir proteindir. Amino ucunda bir PYD bölgesiyle karboksi ucunda bir CARD bölgesi içerir. ASC'nin PYD ve CARD bölümleri protein-protein etkileşim bölümleridir ve ASC'nin oligomerizasyonunda önemli rol oynarlar (108).

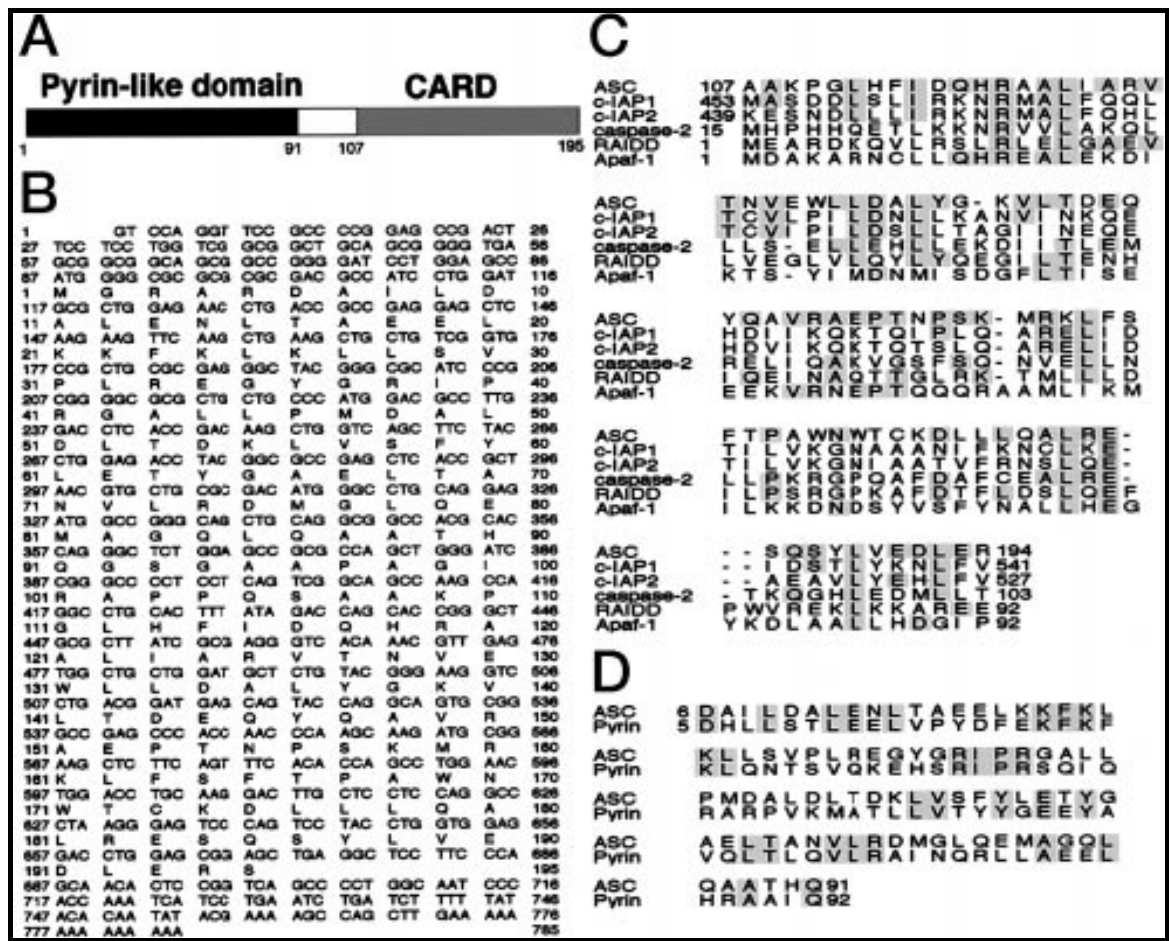
ASC proteininin AAA'dan sorumlu olan MEFV geninin ürünü olan pirin ile etkileşime girdiği ve apoptozu başlattığı bildirilmiştir (109). Bir çalışmada şiddetli apendisit inflamasyonu gösteren hastaların nötrofillerinde ASC'nin arttığı gösterilmiştir (110).

ASC kaspaz 1'in aktivasyonundan sorumlu olan bir aracı moleküldür. ASC'nin diğer bir görevi NF- κ B regülasyonudur. ASC, NF- κ B'yi aktive ya da inhibe edebilir. ASC'a ait PYD bölgesi ile POP1/ASC2'ye ait pirin bölgesine bağlanması, NF- κ B ve prokaspaz 1 regülasyonunda önemli rol oynar (21).

Bununla beraber ASC'nin kaspaz 1 aktivasyonu için önemi farelerde yapılan knock-out çalışmalarında açıklanmıştır. ASC $-/-$ farelerin makrofajlarında kaspaz 1 aktivasyonu ve IL-1 β ve IL-18 üretiminde şiddetli defektler gösterilmiştir. ASC geni içermeyen fareler LPS-indüklenmiş endotoksik şoka direnç göstermişlerdir (111).

ASC'n kromozomal lokalizasyonu flöresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle belirlenmiş ve ASC'n 16p11.2-p12'de lokalize olduğu tespit edilmiştir (112).

ASC genomda PYD ve CARD bölgelerinin birlikte olduğu 2 genden biridir (diğeri NALP1 dir). ASC 785-bp'lik bir cDNA'ya sahiptir ve 22-kDa'luk 195 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. ASC'n N-ucu AAA'dan sorumlu olan MEFV gen ürünü pirin'in N-ucuyla yüksek derecede homoloji göstermektedir (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: ASC'n yapısı ve diğer proteinlerle karşılaştırılması (112)

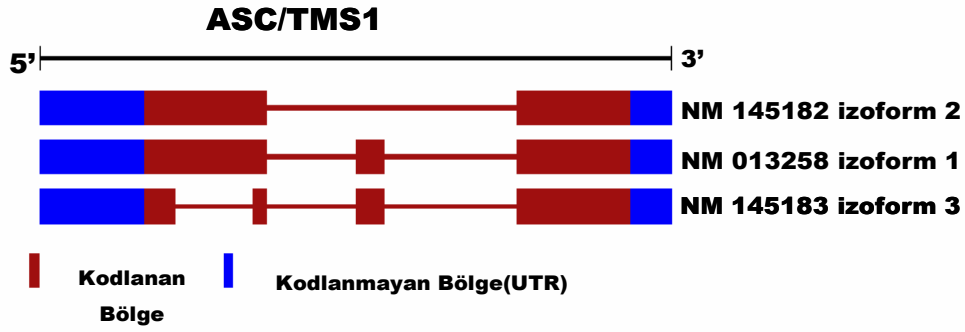
A ASC'n şematik yapısı.

B ASC'n cDNA ve amino-asit sekansları

C ASC, cIAP-1, cIAP-2, caspase-2, RAIDD, ve Apaf-1'in CARD bölgelerinin karşılaştırılması.

D ASC ve Pirin bölgelerinin N- uçlarının karşılaştırılması.

ASC geninin 3 transkript varyantı bildirilmiştir (113). Bu transkript varyantları da ASC'nin 3 farklı izoformunu meydana getirmektedir. İzofom 1 ve 2 pirin bölgesini tam olarak içerirken, üçüncü izoformun pirin bölgesini kodlayan eksonunda nükleotid dizisi eksiktir. (Şekil 2-12).

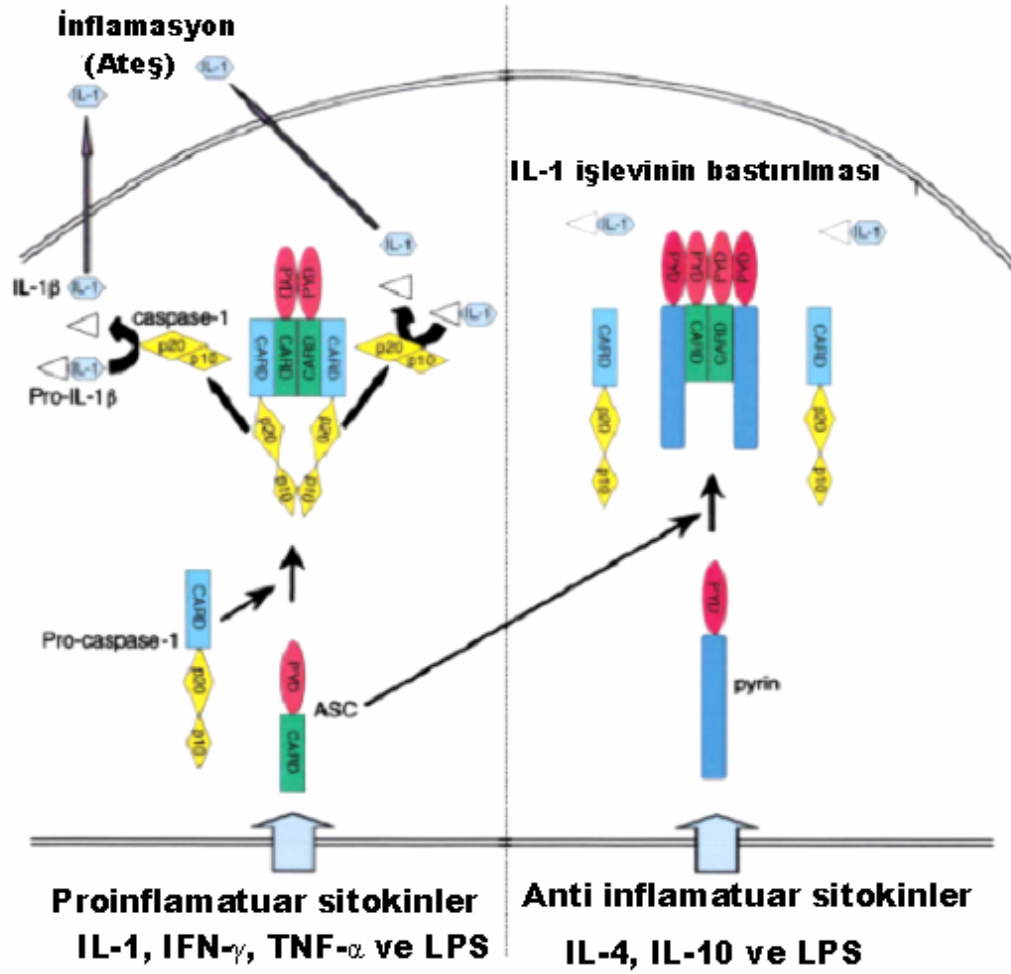


Şekil 2-12:ASC'nin 3 transkript varyantı

2.11 Pirin, ASC, CASP1 ve IL-1 β mekanizması

ASC'nin CARD bölgesi, pro-kaspaz-1'in CARD bölgesine bağlanarak kaspaz 1 yapımını sağlar. Kaspaz 1 de pro-IL-1 β 'dan IL-1 β yapımını sağlar. ASC'nin PYD bölgesine de pirin proteininin PYD bölgesi bağlanarak ASC'nin prokaspaz-1 moleküllerinden ayrılması sağlanarak IL-1 β yapımı baskılanır. Pirin proteininde mutasyon olması durumunda ASC proteinin prokaspaz-1'den ayrılması gerçekleşmeyecek ve sürekli kaspaz 1 yapımı ve aktif IL-1 β yapımı söz konusu olacaktır (Şekil 2-13).

Bu bilgiler ışığında pirinin bir transkripsiyon faktörü olarak proinflamatuvar faktörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu inhibe ederek ya da antiinflamatuvar proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive ederek fonksiyon gösterdiği hipotezi ileri sürülmüştür.



Şekil 2-13: ASC aracılı kaspaz1 oligomerizasyonunda pirin proteininin rolü (114)

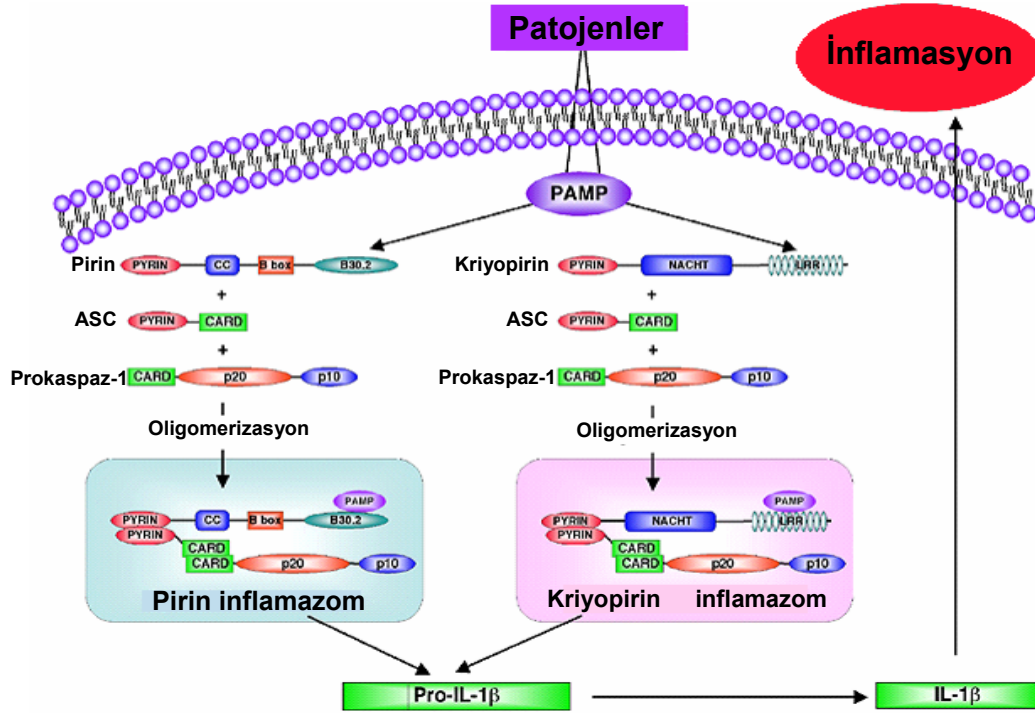
SOL: Proinflamatuar sitokinler ve LPS ASC'ı indükleyerek CARD bölgesi etkileşimleriyle Pro-kaspaz1'e bağlanır ve Pro-kaspaz 1'in kaspaz 1'e oligomerizasyonu sağlar. Aktif p10/p20 alt üniteleri de IL-1 β 'nın inaktif formundan aktif formunun meydana gelmesini sağlayarak inflamasyonu başlatır.

SAĞ: Antiinflammatuar sitokinler ve LPS Pirin'i indükleyerek PYD bölgesi etkileşimleriyle ASC'a bağlanmasını sağlayarak ASC-ın Kaspaz 1 ile etkileşimini engeller.

2.11.1 Pirin ASC'a bağlı CASP1 aktivasyonunu indükler

Pirin'in ASC ile etkileşiminin kaspaz-1 aktivasyonunu arttırdığı ya da inhibe ettiği konusunda şüpheler mevcuttur. Bir dataya göre de pirin, ASC ve prokaspaz-1'in de içinde bulunduğu üçlü bir kompleks oluşturur. Bu kompleks de kaspaz-1 in otoaktivasyonunu sağlar. Gerçekten de pirin ASC'a bağlı kaspaz -1 aktivasyonunda kriyopirin kadar etkindir. AAA mutasyonlarının birçoğunun pirin proteininin C-terminalinde B30.2 bölümünde lokalize olduğu göz önünde tutulursa, mutasyonların bu etkileşimin gerçekleştiği PYD bölgesi yoluyla değil, ama muhtemelen pirin aktivitesinin kontrolünün aksamasıyla inflamasyona yol açtığı söylenebilir.

Kriyopirindeki LRR bölümü ile pirindeki B30.2 bölümü patojenlerin bağlanması açısından benzerlik gösterirler. Patojenlerin bu bölümlerle etkileşimi pirin ve/veya kriopirinin ASC'a bağlanmasını sağlamaktadır (Şekil 2-14). Bu da kaspaz-1'in aktivasyonunu sağlayarak IL-1 β 'nın inflamasyonla sonuçlanan işlevini başlatır (115).



Şekil 2-14: Patojen infeksiyonlarla uyarılan Pirin ve Kriyopirin inflamazomlarının oluşturdukları mekanizma (115).

Patojenlerin kriyopirin ve pirin proteinlerinin LRR veya B30.2 bölgeleriyle tanınması, ASC'in ve Prokaspaz-1'in iki farklı inflamazom kompleksine oligomerizasyonu. Bu kompleksler de pro-IL-1β'yı olgun IL-1β'ya dönüştürür. Bu da infekte hücrelerden çıktıktan sonra inflamasyonu başlatır.

PAMP, pathogen-associated molecular patterns

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışma grubunu, Tel Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı konan 16 hasta oluşturdu. Bu hastalardan akut peritonit atağının ilk 48 saati içerisinde (inflamasyon) ve atak bulguları tamamen düzeldikten sonra (asemptomatik) toplanan venöz kan örneklerinden çalışıldı. Ayrıca kontrol grubu olarak, akut appendisit nedeniyle opere olan 17 hasta alındı ve aynı şekilde hemen operasyon öncesi dönemde (inflamasyon) ve inflamasyon bulguları tamamen geriledikten sonra (asemptomatik) iki örnek kan alındı. Ayrıca 3 tane de sepsisli hasta, ciddi inflamasyon bulgularının etkisini görmek amacıyla çalışma grubuna dahil edildi. Sepsisli hastalardan asemptomatik dönem kan örnekleri alınamadı.

Çalışma grubunu oluşturan hasta ve kontrol grubunun kan örnekleri İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Ana Bilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda Dr. Fatih Selçukbiricik'in tez çalışması sırasında (2003-2005) toplanmıştır. Çalışma grubunun tümünden kan örnekleri alınmadan önce yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır (Bkz.3.1.2). Aynı örneklerin bu çalışma kapsamında kullanılabilmesi amacıyla İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul'una yaptığımız başvuru sonucunda, gerekli izin 12.10.2005 tarihinde alınmıştır. Tez çalışması onay alındıktan sonra, 01.11.2005 tarihi ile 30.06.2006 tarihleri arasında İ. Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1.2 Bilgilendirilmiş onay formu

3.1.3 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Etidyum Bromür

Steril ddH₂O ile 10 mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (10 ml)

10 ml steril ddH₂O içinde % 0.25 Bromfenol mavisi, % 30 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X)

121 g Tris base, 28.5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml EDTA 0.5 M ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Solusyon-D

10 ml EL(eritrosit lizis) çözeltisi içine 100 µl β-Mercaptoethanol eklendi.

3.1.4 Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucu	(+4 ve -20° C Arçelik)
CCD kamera-bilgisayar donanımı	(Mitsubishi-Macintosh)
Çalkalamalı su banyosu	(Memmert)
Çeker ocak	(Kermanlar)
Derin Dondurucu	(-80° C Memmert)
Distile su cihazı	(Kermanlar)
Elektroforez aleti	(Stratagene)
Güç Kaynağı	(Stratagene)
Hassas terazi	(Shimadzu)
Masaüstü mini santrifüj	(Hettich-Eppendorf)
Masaüstü santrifüj +4° C	(Heraeus)
Otoklav	(Kermanlar)
Otomatik Pipetler	(Gilson-Eppendorf)
Real-Time PCR cihazı	(Light-cycler-Roche)
PH metre	(Corning)
Spektrofotometre	(Biotech Photometer WPA)
UV-transluminatör	(Fotodyne)

3.2 YÖNTEM

AAA hastalarından ve akut appendisitli hastalardan inflamasyon sırasında ve inflamasyon sonlandıktan sonra periferik kan örnekleri toplandı. Sepsisli 3 hastadan sadece inflamasyon döneminde kan örnekleri alındı. Periferik kan lökositlerinden Qiagen RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA elde edildi (Qiagen, Almanya). Bu örneklerden daha sonra cDNA sentezi yapıldı. Son olarak da bu cDNA'lar kullanılarak, AAA hastalarda ve kontrollerde CASP1, ASC ve IL-1 β genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) kullanılarak incelendi.

3.2.1 Lökosit İzolasyonu

Lökosit izolasyonu fıkol santrifügasyon yöntemine göre yapıldı. 1.5-5cc. periferik kan örneğinden lökosit izole edildi. Lökosit pelleti 500 μ l solusyon D içinde çözülerek, steril bir tüpte -70°C 'de saklandı.

3.2.2 RNA İzolasyonu

500 μ l solusyon D içindeki lökosit örneği standart kit protokolü kullanılarak izole edildi. İzole edilen total RNA test edildikten sonra steril bir tüpte -70°C 'de saklandı.

3.2.2.1 Tam insan kanından total RNA izolasyonu

QIAamp RNA Blood Mini kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı.

1. Kan örneği, toplam kan miktarının 5 katı EL (eritrosit lizis) solüsyonu ile 50 ml'lik falkon tüpünde karıştırıldı.
2. Örnek 15 dak. $+4^{\circ}\text{C}$ de bekletildi.
3. 10 dak. 1500 rpm da santrifuj edildi. Üst faz atıldı.
4. Hücre peleti vortekslendi. Üzerine total kan örneği miktarının 2 katı EL eklendi.
5. 10 dak. 1500 rpm da santrifuj edildi. Üst faz atıldı.
6. Hücre peleti üzerine 1 ml RLTD solusyonu eklendi. ve 500 μ l x2 olarak 2 ml lik vidalı kapaklı tüplere kondu. Örnekler, kullanılıncaya kadar -80°C de saklandı.

7. RLTD içindeki örnek üzerine 1:1 olacak şekilde %70 lik etanol eklendi. Pipet ile karıştırıldı.
8. Homojenize lizatın 700 µl si, kitden çıkan filtreli tüplere (QIAamp spin column) aktarıldı. 10.000 rpm de 15 sn santrifuj edildi.
9. Toplama tüpündeki süpernatant döküldü. Artan homojenize lizat tüpe eklenip, aynı santrifuj işlemi yapıldı ve tekrar toplama tüpündeki süpernatant döküldü.
10. Tüp üzerine 700 µl RW1 solusyonu eklenerek, 10.000 rpm de 15 sn santrifuj edildi. toplama tüpündeki süpernatant döküldü.
11. Tüp üzerine 500 µl RPE solusyonu eklenerek, 10.000 rpm de 15 sn santrifuj edildi. toplama tüpündeki süpernatant döküldü.
12. Tüp üzerine 500 µl RPE solusyonu eklenerek, 14.000 rpm de 3 dak santrifuj edildi. toplama tüpündeki süpernatant döküldü.
13. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Maksimum hızda 1 dak santrifuj edildi.
14. Filtreli tüp 1.5 ml lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 30 µl RNase-free su eklendi.
15. Örnek, 10.000 rpm de 1 dak santrifuj edildi.
16. RNA dan 2 µl agaroz jelde görüntülemek için ayrıldıktan sonra örnek, kullanılıncaya kadar -80°C ye saklandı.

3.2.3 cDNA SENTEZİ

total RNA	: 10µl (1 µg/µl),
random primer	: 1 µl (0,3 µg/µl),
Su	: 11 µl.
Toplam	: 22 µl.

Bu karışım 70°C’de 5 dakika bekletildi ve 2. karışım ilave edilene kadar buza alındı.

5x RT Buffer	: 8 µl,
10 mM dNTP mix	: 4 µl,
RNase inhibitör (20 U/µl)	: 1 µl,
Su	: 3,5 µl,
Revers Transkriptaz (200 U/µl)	: 1,5 µl.
Toplam	: 18 µl

Bu karışım, ilk karışıma eklendikten sonra 10 dakika 25°C’ye, 60 dakika 42°C’ye ve 10 dakika 70°C’ye maruz bırakıldı. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C’ye kaldırıldı.

3.2.4 Agaroz Jel Elektroferezi

RNA örnekleri %1' lik agaroz jel elektroferezi ile görüntülendi.

3.2.4.1 Agaroz Jelin Hazırlanması ve Yüklenmesi

0.5 gram agaroz tartılarak 50 ml. TAE solüsyonu içinde bir beherde çözündürüldü. Solüsyon ısınıp homojenize olana dek kaynatıldı içerisine 10 mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1 µl, eklendi. RNA örneklerinin jel kuyucuklarına çökmesini sağlamak amacıyla 6X brom fenol mavisi de içeren loading buffer solüsyonundan 1 µl, 2 µl total RNA ve 4 µl ddH₂O ile karıştırılarak jele yüklendi.

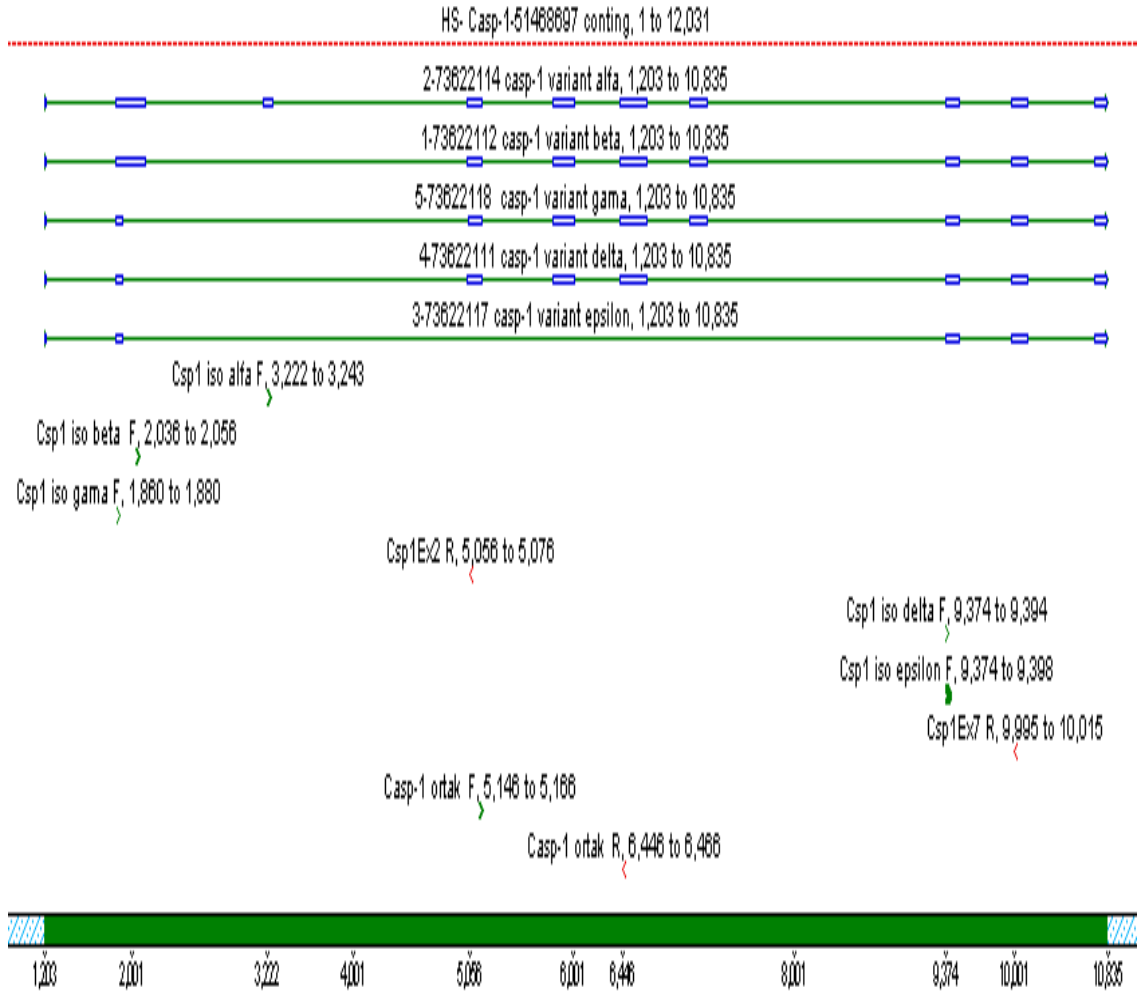
3.2.5 Primerler

cDNA kullanılarak, AAA'lı hastalarda ve kontrollerde CASP1, ASC ve IL1 β genlerinin ekspresyonu incelendi. Bu amaçla aşağıdaki primer setleri kullanıldı. Kaspaz-1 in 5 izoformu için dizayn edilen primerler Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Kaspaz-1 primerleri

		Primer dizileri	Primer Boyu	Ürün Boyu	Gİ No
Casp-1 iso α	F	5' ATTACCTTAATATGCAAGACTC 3'	22 bç	72 bç	73622114
	R	5' GGTTGTCCTGCACTGCCTGAG 3'	21 bç		
Casp-1 iso β	F	5' TTCCGAAAGGGGCACAGGCAT3'	21 bç	114 bç	73622112
	R	5' GGTTGTCCTGCACTGCCTGAG 3'	21 bç		
Casp-1 iso γ	F	5' CAAGGTCCTGAAGGAGAAGAG 3'	21 bç	74 bç	73622118
	R	5' GGTTGTCCTGCACTGCCTGAG 3'	21 bç		
Casp-1 iso δ	F	5' CTGCCGTGGTGATAATGTTTC 3'	21 bç	157 bç	73622111
	R	5' CGCTCTACCATCTGGCTGCTC 3'	21 bç		
Casp-1 iso ϵ	F	5'ATGGGTGAAGATAATGTTTCTTGG3'	24 bç	156 bç	73622117
	R	5' CGCTCTACCATCTGGCTGCTC 3'	20 bç		
Casp-1 ortak	F	5' TATGGAAACAAAAGTCGGCAG 3'	21 bç	230 bç	51468697
	R	5' GTGTGCAAATGCCTCCAGCTC 3'	21 bç		

Not: Casp-1 iso γ için uzama aşamasında 5 saniyenin üstüne çıkılmazsa isoform α ve β 'yı ekarte etmiş oluruz. Casp-1 izoformları için dizayn edilen primerlerin bağlanma ısıları 55°C' ye optimize edilmiştir.



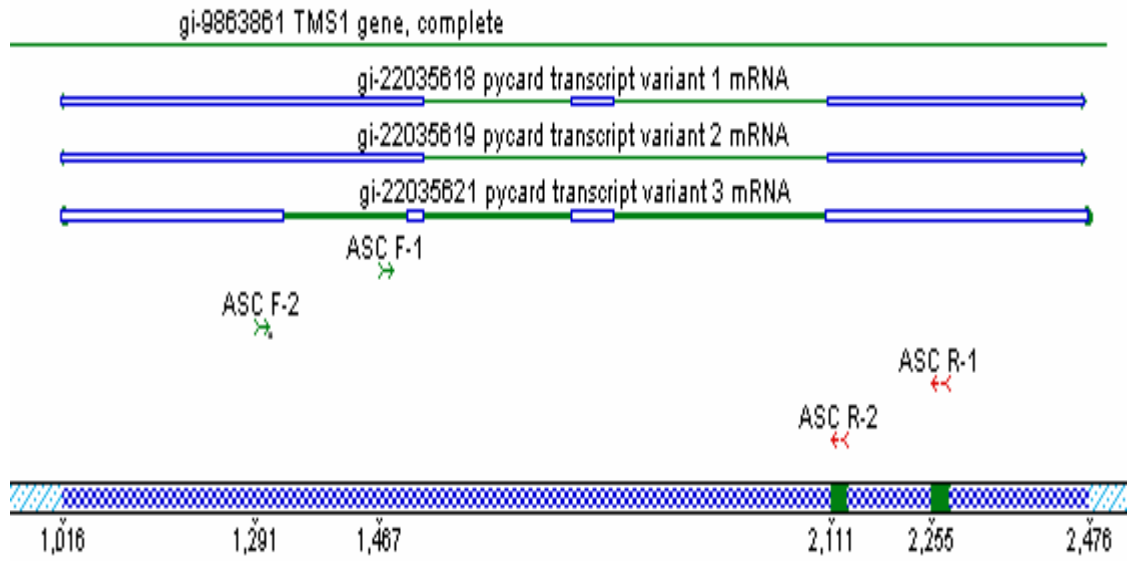
Şekil 3-1: Casp-1 transkript varyantlarının primer dizaynı

— ekson — intron

ASC geni için de Tablo 3-2'deki primerler dizayn edildi.

Tablo 3-2: ASC primerleri

		Primer dizileri	Primer Boyu	Ürün Boyu	Gİ No
ASC Tr 1	F-1	5'ACGTGCTGCGCGACATGG 3'	18 bç	147 bç	22035618
	R-2	5'CCCGGTGCTGGTCTATAAAGT 3'	21 bç		
ASC Tr 2	F-1	5' ACGTGCTGCGCGACATGG 3'	18 bç	234 bç	22035619
	R-1	5' CTGGTGTGAAACTGAAGAGCT 3'	21 bç		
ASC Tr 3	F-2	5' GGAGAACCTGACCGCCGA 3'	18 bç	143 bç	22035621
	R-2	5' CCCGGTGCTGGTCTATAAAGT 3'	21 bç		



Şekil 3-2: ASC/TMS1 transkript varyantlarının primer dizaynı

ekson intron

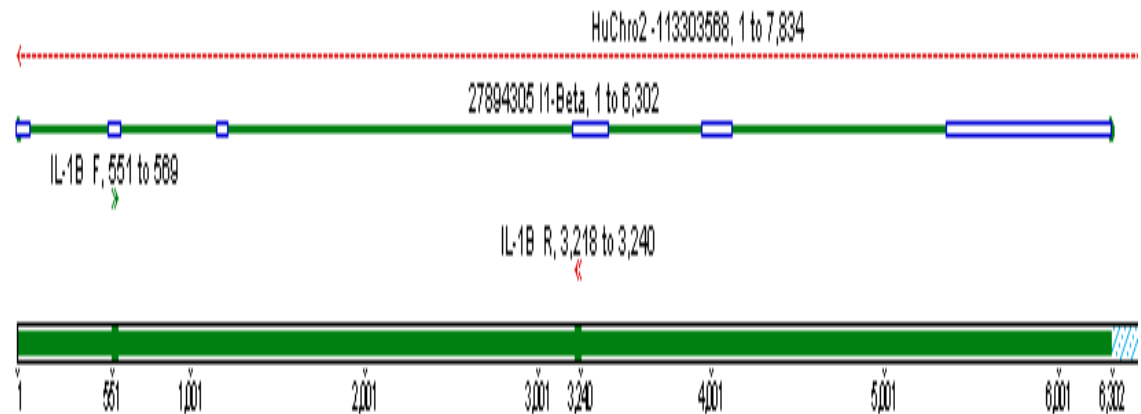
Son olarak IL-1 β için de aşağıdaki primerler dizayn edildi.

F- 5' ATG GCA GAA GTA CCT GAG C 3'

R- 5' ATC CAG AGG GCA GAG GTC CAG GT 3'

Ürün Boyu: 135-bç

Gİ No: 113303568



Şekil 3-3: IL-1 β primer dizaynı

ekson intron

3.2.6 Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR

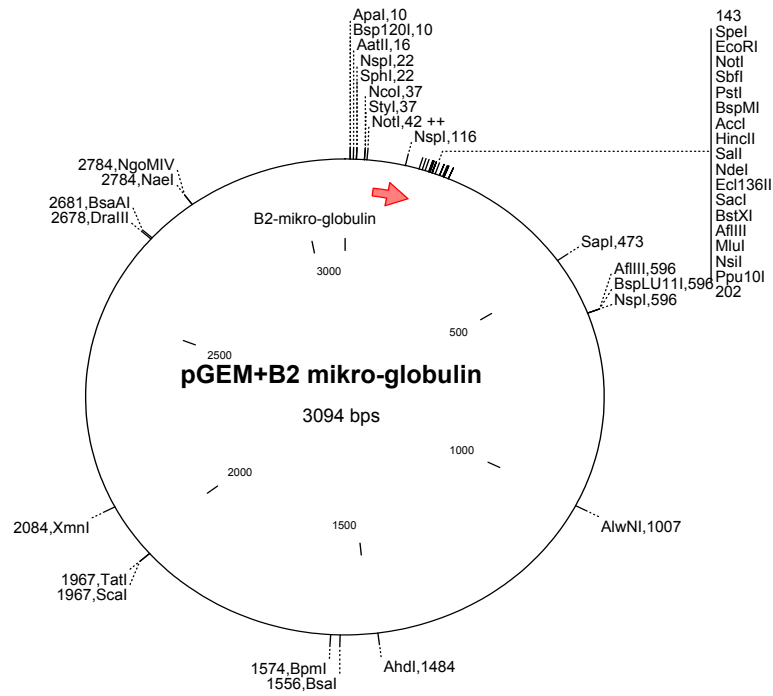
CASP1, ASC ve IL1 β genlerinin amplifikasyonu LightCycler (Roche Diagnostics) aleti kullanılarak yapıldı. Kantitatif değerlendirme yapabilmek amacıyla ekspresyonu sabit olduğu varsayılan “housekeeping” gen (internal kontrol) olarak β 2-mikroglobulin genleri aşağıdaki primerler kullanılarak amplifiye edildi:

B2-micF 5' TGC CGT GTG AAC CAT GTG AC 3'

B2-micR 5' ACC TCC ATG ATG CTG CTT ACA 3

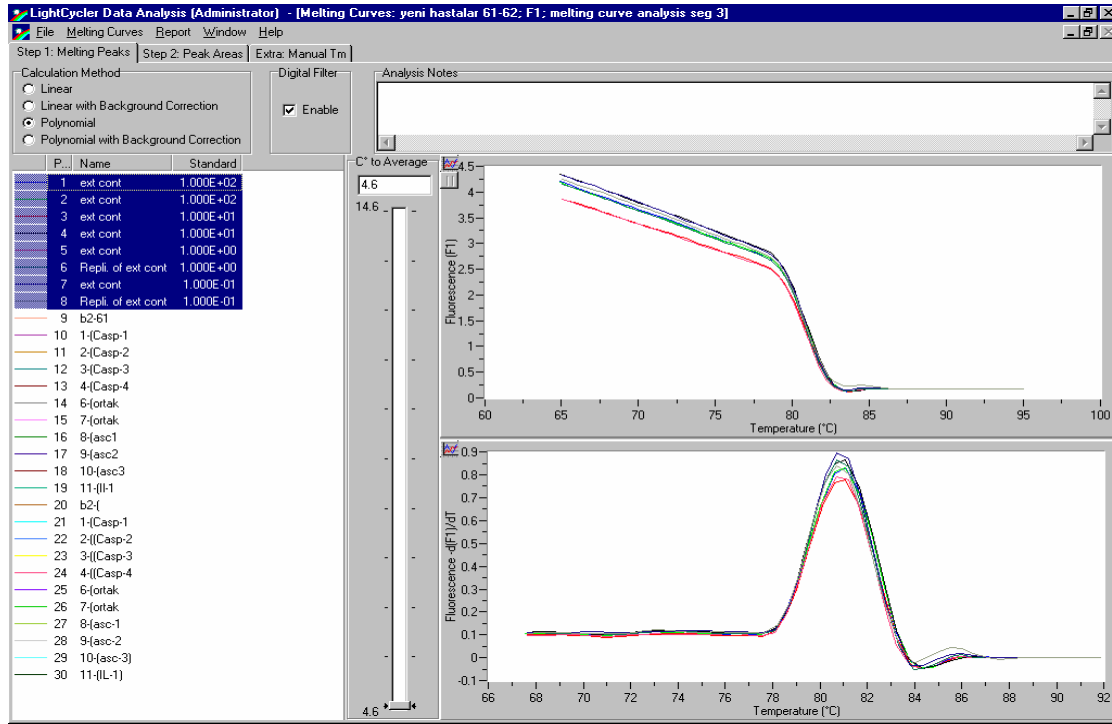
3.2.6.1 Standart Eğri'nin Hazırlanması

Daha önceki çalışmalarımız için pGEM vektörüne klonlanmış olan β 2-mikroglobulin geni standart eğri hazırlanmasında kullanıldı(Şekil 3-4).

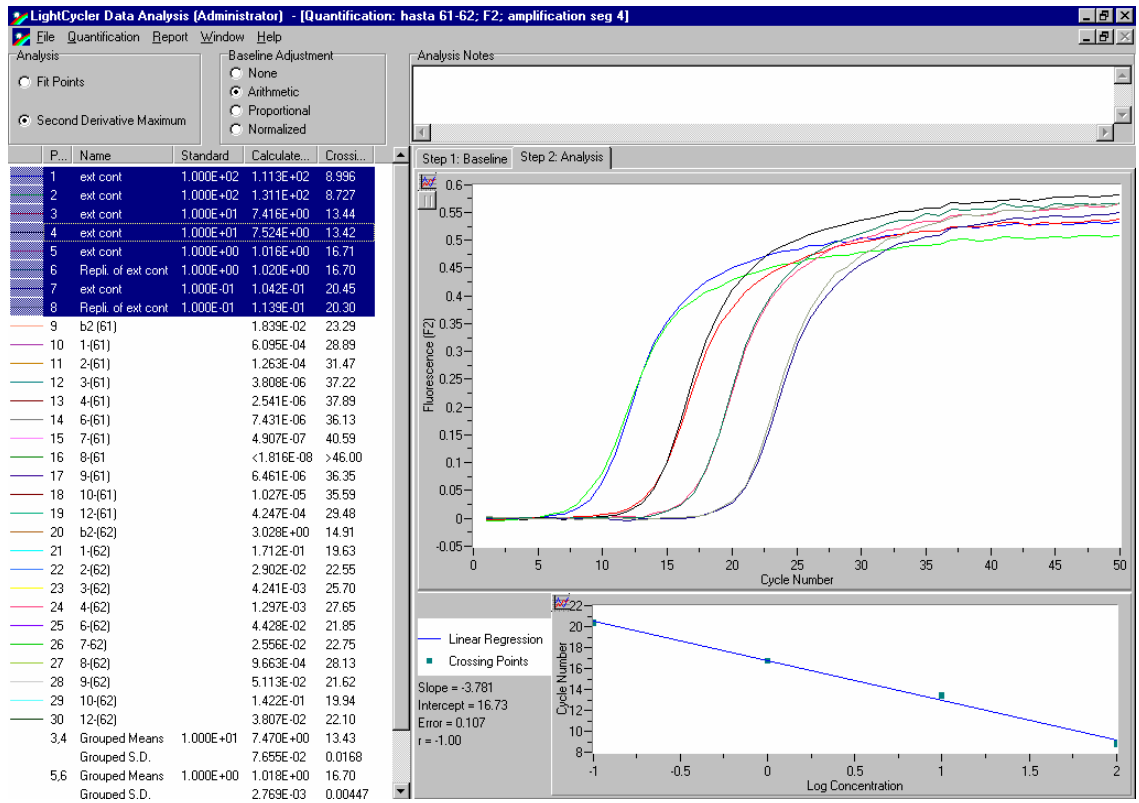


Şekil 3-4: pGEM vektörüne klonlanmış olan β 2-mikroglobulin geni

Klonlanmış $\beta 2$ -mikroglobulin geni kullanılarak, 1000 fentogram dilusyondan başlanarak 10'ar kat azalan 4 dilüsyon kullanılarak 4 standart oluşturuldu (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Standart olarak kullanılan $\beta 2$ -mikroglobulin genine ait erime eğrisi/melting curve.



Şekil 3-6: Standart olarak kullanılan $\beta 2$ -mikroglobulin genine ait standart eğri

Deneylerimizde CASP1 ASC ve IL-1 β genlerinin amplifikasyonu belirleyebilmek için SYBR Green I boyası kullanıldı. SYBR Green I floresan ışımayı saptamak için en sık kullanılan boyadır. SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çift iplikli DNA sayısı arttıkça, yani amplifiye olan cDNA miktarı arttıkça elde edilen floresan miktarı da artar.

PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı melting curve “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edildi. Erime ısı (T_m), genin amplifikasyon ürününün %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler.

CASP1 ASC ve IL1 β genlerinin ekspresyon oranı, houskeeping (her dokuda aynı düzeyde anlatıma giren) genlerinkine oranlandı ve sonuç 100 ile çarpılarak göreceli ifade birimi (GİB) hesaplandı.

3.2.6.2 Kantitatif PCR (QPCR) Materyali:

Primerler (5pmol/ μ l)	1 μ l
Sybr Green mix (Roche)	5 μ l
<u>cDNA</u>	<u>2 μl</u>
Total	10 μ l

Not: Sybr Green karışımı: Takara Ex Taq Hot start , dNTP karışımı , Mg +2 ve Sybr Green I boyası içermektedir.

CASP1 ASC ve IL1B genlerinin amplifikasyonunun tespiti için aşağıdaki kantitatif PCR koşulları kullanıldı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Kantitatif PCR koşulları

Program 1: Denatürasyon			
Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	10 saniye	20
Program 2: Amplifikasyon			
Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	5 saniye	20
2	55°C	10 saniye	20
3	72°C	10 saniye	20
4	77°C	5 saniye	20
Program 3: Melting Curve analizi			
Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	0	20
2	65°C	15	20
3	95°C	0	0.1
Program 4: Soğutma			
Segment	Sıcaklık		Eğim
1	40°C		20

3.2.7 İstatistiksel Yöntemler

Çalışma sonuçları, örnek sayısının azlığı ve normal dağılıma uymamaları nedeniyle non-parametrik yöntemler kullanılarak analiz edildi. AAA hastalarıyla kontroller (akut appendisit hastaları) arasındaki gen ekspresyon oranları arasındaki farklılıklar non-parametrik **Mann Whitney U** testi ile karşılaştırıldı. AAA hastaları ve kontrollerin, inflamasyon dönemi ve asemptomatik dönemlerindeki gen ekspresyonları arasındaki farklılıklar ise, eşleştirilmiş non-parametrik **Wilcoxon** testi ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışma grubunu Tel Hashomer kriterlerine göre AAA tanısı konan 16 hasta, akut appendisit nedeniyle opere olan 17 hasta ve 3 sepsisli hasta oluşturmuştur.

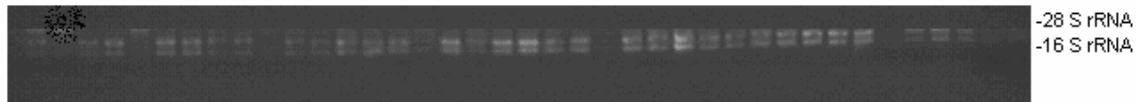
AAA hastalarının akut atak dönemindeki, akut appendisitli hastalarının ameliyat öncesi dönemdeki ve sepsisli hastaların klinik bulgularının devam ettiği dönemdeki, CRP düzeyleri ve lökosit değerleri belirlendi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1:Çalışmaya alınan AAA'lı, akut appendisitli ve sepsisli hastaların, cinsiyet ve yaş verileri ile CRP ve lökosit değerleri

Değerler	AAA (n=16)	Akut Apendisit (n=17)	Sepsis (n=3)
Cinsiyet	8K 8E	5K 12E	1K 2E
Yaş	31,6 ± 12,1	36,4 ± 17,5	51,3 ± 11
CRP(mg/l)	24,4 ± 12,9	19,3 ± 10,7	60,3 ± 14,6
Lökosit(mm3)	13.250 ± 3.068	12.729 ± 2.397	17.667 ± 4.163

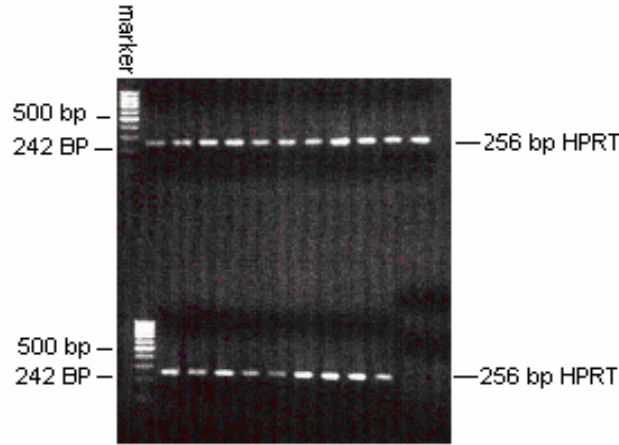
Bu akut faz yanıtı verileri akut dönem olarak nitelenen dönemde, hem AAA hastalarının, hem de kontrol grubunu oluşturan akut appendisitli ve sepsisli hastalarda sistemik inflamatuvar yanıtın varlığını doğruluyordu.

AAA hastalarından ve akut appendisitli hastalardan, inflamatuvar dönemleri düzeldikten sonra asemptomatik dönemlerinde de ikinci kan örnekleri alındı. Toplanmış olan kan örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar agaroz jelde görüntülendi.(Şekil 4-1)



Şekil 4-1: Hastalardan elde edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi

Daha sonra cDNA elde edildi ve bunların özgünlükleri bir housekeeping gen olan HPRT ile kontrol edildi. (Şekil 4-2)

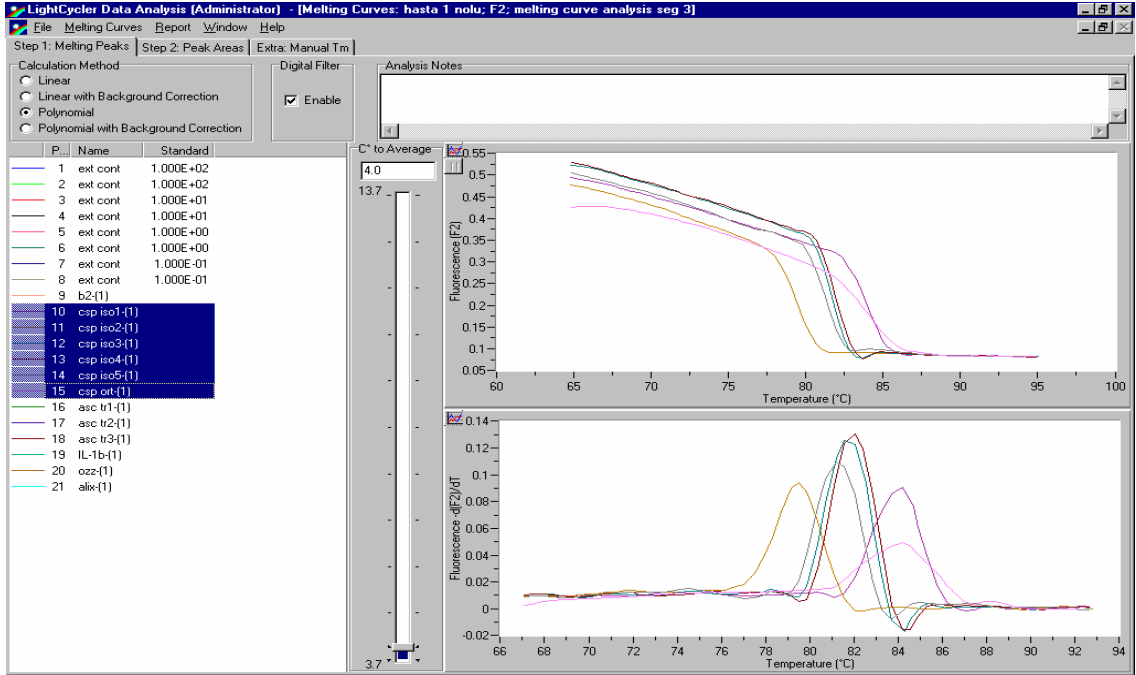


Şekil 4-2: cDNA sentezi kontrolü için HPRT geni kullanıldı.

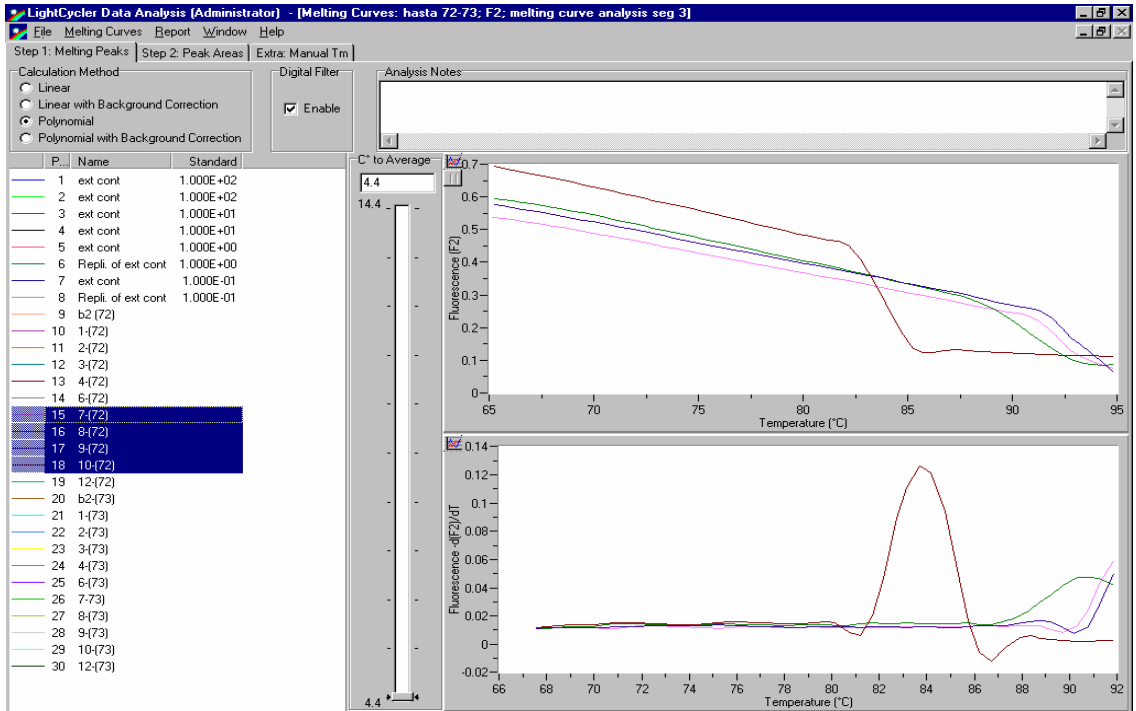
Hedeflenen genlerin ekspresyonları gerçek zamanlı PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) kullanarak incelendi. Ayrıca, LightCycler da elde edilen ürünlerin özgünlüklerinin kontrolü amacıyla, her ürün için ayrı ayrı *melting curve* analizi sonuçları ve grafikleri kontrol edildi. Şekillerde de görülebileceği gibi hedef bölgeler dışında (β 2-mikroglobulin, CASP1, ASC ve IL1B) non-spesifik bir amplifikasyona rastlanmadı. Her gene ait *melting curve* tek tek değerlendirildi (Şekil 4-3 ve Şekil 4-4).

Tablo 4-2: Melting curve değerleri

Çalışılan genler	Erime Eğrisi
CASP1 iso α	79°C
CASP1 iso β	84°C
CASP1 iso γ	81°C
CASP1 iso δ	82°C
CASP1 iso ϵ	81,5°C
CASP1-ort	83,5°C
ASC1	92°C
ASC2	86°C
ASC3	91°C
IL1-B	83°C



Şekil 4-3: Akut appendisitli hastalardan bir ornekte (No:1) CASP1 gen ürünlerine ait melting curve değerleri ve grafikler.

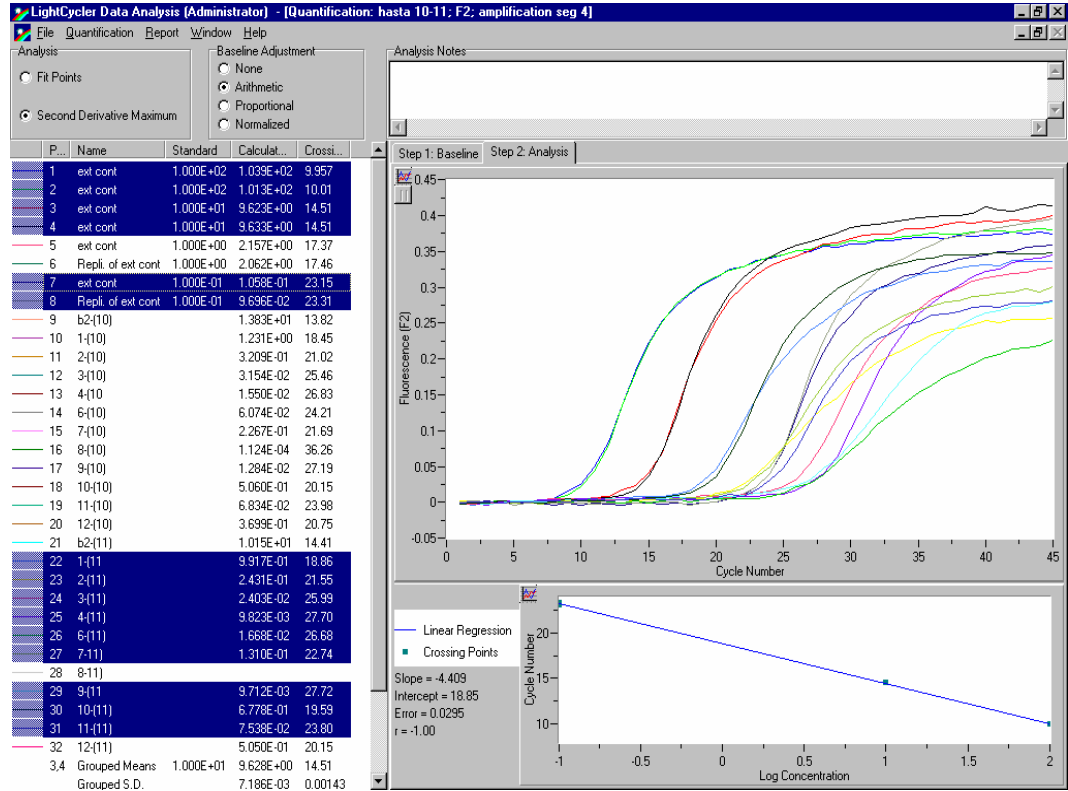


Şekil 4-4: AAA atak dönemi, 72 numaralı örnekte ASC ve IL-1B geni ürünlerine ait melting curve değerleri ve grafikler.

Bu sonuçlar elde edildikten sonra, örneklerin CASP1, ASC ve IL1 β gen ekspresyon dereceleri standart curve değerleri kullanılarak (pGEM+ β 2-mikroglobulin plasmid) ve internal kontrol (β 2-mikroglobulin) genlerinin ekspresyon dereceleri ile oranlanarak göreceli ifade birimleri (GİB) hesaplandı.

Standart eğri de β 2-mikroglobulin ile hazırlandığı için GİB değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{GİB} = \text{Hedef gen ekspresyonu} / \beta 2\text{-mikroglobulin ekspresyonu} \times 100$$



Şekil 4-5: Genlerin ekspresyon dereceleri

Çalışma grubunda elde edilen CASP1 ekspresyon oranları Tablo 4-3’de, ASC ve IL1 β ekspresyon oranları Tablo 4-4’de verildi. İnflamasyon yazılı örnekler, akut atak (AAA hastaları) ya da inflamasyon yanıtının olduğu dönemde (akut appendisit ve sepsis) toplanmış olan örneklerdir. Asemptomatik yazılı örnekler ise, akut atak ya da inflamatuvar yanıt sonlandıktan sonra asemptomatik dönemde toplanmış olan örneklerin verilerini göstermektedir.

Tablo 4-3: İnflamasyon (akut atak ya da hastalık) ve asemptomatik dönemlerde CASP1, izoformlarının β 2-mikroglobulin genine oranla göreceli ifade birimleri (GİB) (ortalama $\pm$ standart sapma)

CASP1	Asemptomatik		İnflamasyon		
	AAA (n=16)	Akut Apendisit (n=17)	AAA (n=16)	Akut Apendisit (n=17)	Sepsis (n=3)
İzoform α	0,89 $\pm$ 0,84	2,21 $\pm$ 1,3	0,73 $\pm$ 0,42	1,76 $\pm$ 1,09	0,43 $\pm$ 0,11
İzoform β	3,77 $\pm$ 3,25	7,88 $\pm$ 3,15	4,62 $\pm$ 1,68	6,48 $\pm$ 3,97	2,81 $\pm$ 0,8
İzoform γ	0,05 $\pm$ 0,17	0,06 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,02	0,005 $\pm$ 0,008
İzoform δ	0,58 $\pm$ 2,22	0,14 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,01
İzoform ϵ	0,17 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,20	0,15 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,20	0,1 $\pm$ 0,02
Ortak	0,56 $\pm$ 0,63	0,74 $\pm$ 0,63	0,99 $\pm$ 0,47	0,90 $\pm$ 0,63	0,66 $\pm$ 0,08

CASP1’in farklı izoformlarına yönelik ve tüm izoformları hedefleyen CASP1 ortak ekspresyon değerlendirmesinde, izoform β ’nın ekspresyonunun diğer izoformlardan ve CASP1-ortak’dan daha fazla olduğu gözlemlendi.

AAA hastalarında asemptomatik dönemde CASP1 izoform α , izoform β ve izoform ϵ gen ekspresyonu, sağlıklı kontrollere göre (asemptomatik dönemde akut appendisit hastaları) anlamlı olarak azalmış bulundu (izoform α için $P < 0,001$, izoform β için $P < 0,001$, izoform ϵ için $P = 0,001$ non-parametrik Mann Whitney U). AAA hastalarında asemptomatik dönemde izoform δ da ise gen ekspresyonu, sağlıklı kontrollere göre (asemptomatik dönemde akut appendisit hastaları) anlamlı olarak artmış bulundu ($P = 0,001$ non-parametrik Mann Whitney U). Fakat inflamasyon döneminde izoform δ ekspresyonu AAA hastalarında sağlıklı kontrollere göre (asemptomatik dönemde akut appendisit hastaları) azalmış bulundu.

AAA hastalarında ve akut appendisitli hastalarda, inflamasyon döneminde CASP1 izoform β , izoform γ ve CASP1-ortak ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmezken, izoform α , izoform ϵ ve izoform δ ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu görüldü (izoform α için $P = 0,003$, izoform ϵ için $P = 0,006$, izoform δ için $P < 0,001$ non-parametrik Mann Whitney U).

Tablo 4-4: İnflamasyon (akut atak ya da hastalık) ve asemptomatik dönemlerde ASC ve IL1- β genlerinin β 2-mikroglobulin genine oranla göreceli ifade birimleri (GİB) (ortalama $\pm$ standart sapma)

ASC& IL-1 β	Asemptomatik		İnflamasyon		
	AAA (n=16)	Akut Apendisit (n=17)	AAA (n=16)	Akut Apendisit (n=17)	Sepsis (n=3)
ASC İzo 1	0,66 $\pm$ 0,59	1,34 $\pm$ 1,05	0,58 $\pm$ 0,19	1,16 $\pm$ 0,74	0,54 $\pm$ 0,2
ASC İzo 2	6,62 $\pm$ 9,72	5,49 $\pm$ 11,04	0,02 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,21	0,008 $\pm$ 0,001
ASC İzo 3	0,79 $\pm$ 0,49	0,31 $\pm$ 0,34	0,15 $\pm$ 0,17	0,42 $\pm$ 0,36	0,52 $\pm$ 0,19
IL-1 β	2,46 $\pm$ 2,29	4,4 $\pm$ 2,9	2,80 $\pm$ 1,3	2,68 $\pm$ 1,62	1,69 $\pm$ 0,39

AAA hastalarında asemptomatik dönemde, ASC izoform1 ve IL1 β ekspresyonunun da sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak azalmış olduğu (ASC izoform1 için $P = 0,002$ ve IL1 β için $P = 0,019$ non-parametrik Mann Whitney U) görüldü.

ASC izoform1, izoform2, izoform3 ve IL-1 β için AAA hastalarında ve akut appendisitli hastalarda, inflamasyon döneminde anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Genel olarak CASP1 ekspresyonu AAA hastalarında azalmış olmakla beraber, akut appendisitli kontrollerin ve AAA hastalarının inflamasyon ve asemptomatik dönemlerinde çok belirgin bir ekspresyon farkı yoktu.

CASP1 izoform α , izoform β , izoform ϵ , izoform δ , CASP1 ortak gen ekspresyonu, akut appendisitli hastaların inflamasyonlu ve asemptomatik dönemlerinde anlamlı bir farklılık göstermedi. CASP1 izoform γ de anlamlı bir farklılık ($P = 0,01$ non-parametrik Wilcoxon testi) göze çarpmasına rağmen GİB 'nin çok düşük olması nedeniyle anlamlılığı sorgulanmadı.. CASP1 ortak ekspresyonunda, akut appendisitli hastaların inflamasyon döneminde bir miktar artış gözlemleniyse de, aradaki fark istatistiki anlamlılığa ulaşmadı ($P = 0,332$ non-parametrik Wilcoxon testi).

AAA hastalarında da, akut atak döneminde periferik kan hücrelerinde CASP1 izoform α , izoform β , izoform γ , izoform δ , izoform ϵ , CASP1-ortak, ASC izoform1, ASC izoform3 ve IL1 β gen ekspresyonu anlamlı bir farklılığa ulaşmadı.

Bununla beraber, ASC izoform2 için hem AAA hastalarında, hem de akut appendisitli kontrollerde inflamasyon döneminde anlamlı bir ekspresyon azalması saptandı (AAA hastalarında $6,62 \pm 9,72$ 'den $0,02 \pm 0,01$ ' e azalma $P = 0,013$, akut appendisitli hastalarda $5,49 \pm 11,04$ 'den $0,06 \pm 0,21$ 'e azalma, $P = 0,05$).

Sepsisli hastaların CASP1 izoform1, izoform2, izoform3, izoform4, izoform5; ASC geni izoform1, izoform2 ile IL1 β ekspresyonu, akut appendisitli ve AAA'lı bireylerden daha düşükse de, AAA hastaları ile aralarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılığa ulaşmadı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada AAA hastalığı ile ilişkisi MEFV geninin ürünü olan pirin proteininin etkileştiği ASC proteininin inflamasyon atakları sırasındaki mRNA düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri, CASP1 ve IL1 β genleri ile birlikte incelenmiştir.

Sınırlı sayıda hastadan akut peritonit atağı sırasında toplanan periferik kan örneklerindeki bulgular, bir edinsel peritonit nedeni olan akut appendisitli hastalardan elde edilen örneklerdeki verilerle karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda, inflamasyonun etkilerini doğrulayabilmek amacıyla, sepsise bağlı ciddi inflamasyon bulguları olan 3 hasta da çalışmaya alınmıştır.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, ASC geninin 3 ayrı izoformunun ekspresyonları incelendiğinde, PYD ve CARD bölgeleri arasında, küçük bir bağlantı bölgesi (ekson 2) içermeyen izoform 2'nin baskın izoform olduğu ve asemptomatik dönemde AAA hastaları ile kontroller arasında anlamlı bir fark göstermediği anlaşılmıştır. Bununla beraber, inflamasyon sırasında izoform1 ve izoform3 ekspresyonunda belirgin bir farklılık gözlenmez iken, izoform2 mRNA ekspresyon düzeyi hem AAA hastalarında, hem de akut appendisitlilerde >%98 azalmıştır.

AAA hastalarında CASP1 ekspresyonu akut appendisitli hastalara oranla azalmış bulunmakla beraber, hem hastalarda hem de akut appendisitli kontrollerde, asemptomatik dönem ile inflamasyon dönemleri arasında çok belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

IL1 β ekspresyonu yönünden, akut appendisitli hastaların asemptomatik dönemlerindeki IL1 β mRNA düzeyi AAA hastalarına göre artmış bulunmuşsa da, inflamasyon döneminde 2 grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Bulguları tartışmaya geçmeden önce, kullanılan yöntemin ekspresyon analizi ile ilgili olası sorunlarını tartışmakta yarar vardır:

Bu çalışmada söz konusu genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonları gerçek zamanlı PCR yöntemiyle incelenmiş ve elde edilen veriler protein düzeyinde doğrulanmamıştır. Bu nedenle verilerin, bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Çalışmamızda elde edilen ekspresyon değerleri, her hücrede ifade edilen ve ‘housekeeping’ gen olarak kabul edilen diğer bir gen ile karşılaştırılarak göreceli olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde, hedef genlerin farklı izoformlarının da kendi aralarında göreceli ekspresyon değerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bununla beraber, bulgular bölümünde de tartışıldığı gibi hedef gende çoğaltılan ürünün büyüklüğü, hedeflenen genom bölgesi ve diğer PCR reaksiyonu değişkenlerine bağlı olarak, PCR etkinliği de ekspresyon değerleri üzerine etkili olmaktadır. Örneğin CASP1 geninde ortak bölgeyi hedefleyen primerler ile, incelenen izoformların ikisinden daha düşük değerler elde edilmiştir. Bu sonuçta, çoğaltılan ürünün diğerlerinden büyüklüğü (230-bç) ve/veya diğer PCR değişkenleri rol oynamış olabilir.

Bir diğer konu da ekspresyon analizi yapılan hücre kaynaklarıdır. AAA hastalığında seröz zarlardaki inflamasyon bölgelerine yoğun nötrofil toplanması olmakta ve AAA karakteristik olarak nötrofiller tarafından oluşturulan bir hastalık olarak kabul edilmektedir. MEFV geninin de öncelikle nötrofillerde ve uyarılmış monositlerde, bir miktar da fibroblastlarda eksprese olduğu bilinmektedir. Sonuçta MEFV üzerinden gelişen inflamatuvar yanıt, IL-1 β başta olmak üzere sitokinler aracılığı ile gelişmekte ve oluşan akut faz yanıtı da farklı sitokinlerin aktivasyonu ile regüle edilmektedir (116). Bir çalışmada şiddetli apendisit inflamasyonu gösteren hastaların nötrofillerinde ASC’nin arttığı gösterilmiştir (110).

Bizim çalışmamızda ekspresyon araştırmaları periferik kan beyaz hücrelerinde yapılmıştır ve ASC ile IL-1 β genlerinde izole nötrofillerde görülen ekspresyon artışı, periferik kan tüm beyaz hücrelerinde çalışıldığında saptanamamıştır.

Bu sonuçlar üzerinde etkili olabilecek unsurlardan birisi hücre kaynağı, diğeri de örneklerin toplanma zamanıdır. Öncelikle İnflamasyonun gerçekleştiği doku düzeyinde IL-1 β ekspresyonu farklı dinamikler gösterebilir (17,117). Ailevi soğuk otoinflamatuvar sendromu olan hastalarda yapılan bir çalışmada, inflamatuvar yanıt sırasında periferik kan hücrelerinde IL-1 ekspresyonunda bir değişme görülmezken, keratinositlerde IL-1 mRNA ve protein düzeylerinin arttığı saptanmıştır (118). Dolayısıyla, periferik kanda elde ettiğimiz bulguların doku düzeyinde de doğrulanması gereklidir.

Benzer şekilde IL-1 β ekspresyonu inflamasyonun erken saatlerinde artarken, ilerleyen zaman içerisinde ekspresyonu normal hale gelebilir. İnflamasyonun en önemli araçlarından biri olması nedeniyle IL-1b sentezi ve aktivasyonu, farklı düzeylerde çok

sıkı kontrol edilmektedir. Bu nedenle inflamasyon uyarısı geldikten sonra öncelikle mRNA ekspresyonu ve öncü protein sentezi artmaktadır. Bununla birlikte, IL-1 β aktivasyonunun tamamlanması için inflamazom üzerinden yürüyen ikinci yolun da uyarılması ve kaspaz 1 ile öncü proteinin enzimatik kesilmesi ile sitokin aktive olması gereklidir. Bu nedenle çalışılan hücre kaynağı ve zaman diliminde mRNA düzeylerinde farklılık gözlenememesi, IL-1 β 'nın aktive olmadığı anlamına gelmemektedir. Örneklerin klinik ortamda toplanması, hastaların başvuru saatlerine göre değişkenliğe ve erken dönemde örneklerin bulunamamasına yol açmaktadır. Buna bağlı olarak, hücre dizileri ile laboratuvar koşullarında elde edilen sonuçların farklılıklar içermesi beklenebilir. Mevcut koşullarda, protein düzeyinde ekspresyonun incelenmesi sorunun aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Bu noktada çalışmamızdaki ekspresyon araştırmasının neden periferik kan hücrelerinde yapıldığını tartışmakta yarar vardır. MEFV geninin nötrofillerde ve uyarılmış monositlerde ifade edildiğini biliyoruz. Bununla birlikte, daha önce yapılan bir çalışmada nötrofillerdeki MEFV ekspresyonu ile periferik kan beyaz hücrelerindeki MEFV ekspresyonu karşılaştırıldığında, çok benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür (17). Bu nedenle, hem elde etmedeki kolaylık, hem de nötrofil-monosit ayırımı sırasında ortaya çıkabilecek mRNA etkilenmelerinden kaçınmak amacıyla, periferik kan beyaz hücrelerinden doğrudan RNA elde edilerek ekspresyon analizi yapılmıştır. Bununla beraber, elde edilen sonuçların ASC, CASP1 ve IL1B yönünden de, diğer hücre kaynakları ile birlikte doğrulanması yararlı olacaktır.

Pirin proteininin, normal koşullarda nötrofil aracılı inflamasyonu kontrolden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu etkisini transkripsiyon faktörü olarak etki göstererek proinflamatuvar faktörleri kodlayan gen ya da genlerin ekspresyonunu inhibe ederek ya da antiinflamatuvar proteinleri kodlayan gen ya da genlerin ekspresyonunu aktive ederek gösterebileceği ileri sürülmüştür.

Pirin proteininin amino ucundaki pirin bölümünün apoptoz yolunun düzenlenmesinden sorumlu “ölüm reseptörü” proteinleri ile aynı aileye ait olduğu anlaşılmıştır. Bu bölümün, ölüm reseptörü ailesinin diğer proteinlerinde olduğu gibi, benzer bölümlerle homotipik etkileşime girmesi beklenmelidir. Nitekim, pirin proteininin pirin bölümünün bir adaptör protein olan ASC proteininin pirin bölgesine bağlandığı, böylece ASC proteini üzerinden yürüyen bir dizi etkileşimi kontrol ettiği

anlaşılmıştır. ASC proteini amino ucunda pirin, karboksi ucunda da kaspazları toplayıcı CARD bölümü içeren küçük bir proteindir. ASC'ın pirin bölümü, kriyopirin proteininin pirin bölümüne bağlanarak polimerize olmakta, açıkta kalan CARD bölümleri ise kaspaz-1 enziminin CARD bölümleriyle etkileşime geçip, kaspaz-1 enzimini aktive etmektedir. Kaspaz-1 hem IL-1 β sitokininin proteolitik aktivasyonundan, hem de apoptoz yolunun uyarılmasından sorumludur. Pirin proteininin ASC ile bağlanarak, kriyopirin-ASC etkileşimini ve kaspaz-1 aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir. Pirin fonksiyonunda bozulma olduğunda, kaspaz-1 aktivasyonu üzerinden IL-1 β inflamasyon kaskadında ve apoptoz yolunda düzensizliklerin geliştiği ve bunun AAA hastalığının temelini oluşturduğu düşünülmektedir (114). Aynı araştırmacıların çok yeni verileri, pirin proteinin B30.2 bölgesinin doğrudan kaspaz 1 ile de etkileşebileceğini ve kaspaz 1 aktivasyonunu etkinleştirebileceğini de göstermektedir (54). Bu bilgiler ışığında inflamasyon döneminde pirin proteininin ASC aktivasyonunu dengeleyememesinin inflamasyon ile sonuçlanması beklenmektedir. AAA hastalarında MEFV ekspresyonunun azalmış olması bu dengeyi inflamasyon lehine bozmaktadır. Bununla beraber hastalarda inflamasyon ataklar halinde görülmekte ve hastalarda inflamasyon bulguları atak arası dönemde genellikle normal sınırlara dönebilmektedir. Bu durum da, organizmanın MEFV ekspresyonunun azalması ile bozulmuş olan dengeyi, yeni bir denge durumuyla korumaya çalışmasına, bunun sonucunda da CASP1 ekspresyonunda azalmaya neden olmuş olabilir. Yani çalışmamızda saptamış olduğumuz AAA hastalarında CASP1 ekspresyonu azalması, organizmanın sürekli inflamatuvar yanıtı dengelemek amacıyla sağladığı homeostatik düzenlemenin bir işareti olabilir.

CASP-1 geninin alternatif kesimi sonucunda 5 adet transkript varyantından α , β , γ izoformları apoptozu meydana getirirlerken izoform δ 'nın apoptotik bir etkisi yoktur. İzoform ϵ de hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlar (93). Bu çalışmamızda izoform δ 'nın AAA hastalarında asemptomatik dönemde sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır. Yalnız inflamatuvar yanıtta aynı artışı gözlemleyemedik. Burdan yola çıkarak izoform δ 'nın AAA hastalarında sadece asemptomatik dönemde diğer izoformlara oranla daha fazla eksprese edildiği söylenebilir.

Bu çalışmada saptadığımız bulguların en çarpıcı olanı, ASC geninin izoform2 varyantının AAA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde asemptomatik dönemde benzer düzeyde eksprese edilmesine rağmen, hem AAA hastalarında hem de kontrollerde inflamasyon döneminde belirgin bir seviyede azalmasıdır. Bu bulgu bize ASC geninin 2. transkriptinin inflamasyon kontrolünden öte apoptozda rol alabileceğini düşündürmektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi, kaspaz 1 hem apoptoz uyarılmasında, hem de IL-1 β aktivasyonu ile inflamasyon kontrolünde görev yapmaktadır. Bununla beraber, hücrenin apoptoz ya da inflamasyon tercihini nasıl yaptığı ve hangi aracı moleküllerin bu seçimde görev yaptığı bilinmemektedir. Bu çalışmada ASC geninin bir izoformunun inflamasyon sırasında belirgin ekspresyon farkı göstermesi nedeniyle, inflamasyon sırasında izoform 1'in baskın rol oynadığı, izoform 2'nin ise daha ziyade apoptoz uyarısında görevli olabileceği düşünülebilir. Bu verilerin mutlaka apoptotik hücrelerde de hem mRNA, hem de protein ekspresyonu düzeyinde doğrulanması gereklidir. Çünkü ASC ile apoptoz arasındaki ilişkinin aydınlatılması sadece inflamatuvar hastalıklar yönünden değil, kanser araştırmaları açısından da büyük önem taşımaktadır. Güncel veriler ASC geninin metilasyonu ile çeşitli neoplastik hastalıkların gelişimi arasında ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (119). Bu nedenle, verilerimizin diğer koşullarda da doğrulanması, kanser araştırmaları için de önemli bir konuyu gündeme getirecektir.

Elde edilen sonuçlar AAA hastalığında Pirin proteininin ASC ile etkileşimi kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β inflamasyon kaskadında ve apoptoz yolunda yeni bir homeostatik dengenin oluştuğunu düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçlarının bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bernot A, da Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, ve ark. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1317-25.
2. Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, ve ark. Familial Mediterranean fever: Effect of genotype and ethnicity on Inflammatory Attacks and Amyloidosis. *Pediatrics* 2000; **5**: 1-7.
3. Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, ve ark. 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 Gen* 1999; **65**: 88-97.
4. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Migdal A, Sohar E, ve ark. The changing face of the familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1996; **26**: 612-27.
5. The French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature Genetics* 1997; **17**: 25-31.
6. Chen X, Fischel-Ghodsian N, Cercek A, Hamon M, Ogur G, Lotan R, ve ark. Assessment of pirin Gene mutations in Turks with familial Mediterranean fever (FMF). *Human Mutation* 1998; **11**: 456-60.
7. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot-Thoraval F, Genevieve D, Mndjoyan E, ve ark. Identification of MEFV-Independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Human Genetic* 2000; **67**: 1136-43.
8. Majeed HA, Rawashdeh M, el-Shanti H, Qubain H, Khuri-Bulos N, Shahin HM. Familial Mediterranean fever in children: the expanded clinical profile. *Q J Med* 1999; **92**: 309-18.
9. Tamir N, Langevitz P, Zemer D, Pras E, Shinar Y, Padeh S, ve ark. Late-Onset familial Mediterranean fever (FMF): A subset with distinct clinical, demographic and molecular genetic characteristics. *Am J Med Genetic* 1999; **87** :30-35.

10. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE Jr, Prosen L, Dean M, ve ark. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992; **326**: 1509-13.
11. Shohat M, Bu X, Shohat T, Fischel-Ghodsian N, Magal N, Nakamura Y, ve ark. The gene for familial Mediterranean fever in both Armenians and non-Ashkenazi Jews is linked to the α -globin kompleks on 16p: Evidence for locus homogeneity. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 1349-54.
12. International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; **90**: 797-807.
13. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, ve ark. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 1879-85.
14. Grateau G. The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; **12**: 61-64.
15. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, ve ark. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European Journal of Human Genetics* 2001; **9**: 553-55.
16. Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattan D, Dervichian M, Goossens M, ve ark. Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000; **92**: 241-246.
17. Notarnicola C, Didelot M-N, Koné-Paut I, Seguret F, Demaille J, Touitou I. Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 2785-93.
18. Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**: 61-9.
19. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; **10**: 417-26.

20. Liepinsh E, Barbals R, Dahl E, Sharipo A, Staub E, Otting G. ve ark. The death-domain fold of the ASC pyrin domain, presenting a basis for pyrin/pyrin recognition. *J Mol Biol* 2003; **332**: 1155–63.

21. Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, ve ark. ASC is an activating adaptor for NF- κ B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2003; **303**: 69–73.

22. Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. ve ark. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J Immunol.* 2003; **171**: 6154–63.

23. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, ve ark. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 39320–29.

24. Selçukbiricik F. Ailevi Akdeniz ateşi olan hastalarda atak sırasında ve ataklar arası dönemde MEFV gen ekspresyonunun incelenmesi. İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2005.

25. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, ve ark. Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; **20** (Suppl 26): S45-53.

26. Hoffman HM, Patel DD. Genomic-based therapy: targeting interleukin-1 for autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum.* 2004 ;**50**:345-9.

27. Aganna E, Aksentijevich I, Hitman GA, Kastner DL, Hoepelman AI, Posma FD, ve ark. Tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS) in a Dutch family: Evidence for a TNFRSF1A mutation with reduced penetrance. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 63–6.

28. Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH. Familial cold autoinflammatory syndrome: Phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**: 615–20.

29. Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, van Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ, ve ark. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause

hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; **22**: 175–7.

30. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van de Velde-Visser SD, de Jong JG, ve ark. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; **22**: 178–81.

31. Drenth JPH, Haagsma CJ, Van der Meer JWM. Hyperimmunoglobulinamia D and periodic fever syndrome. The clinical spectrum in a series of 50 patients. International hyper IgD Study Group *Medicine* 1994; **73**: 133–44.

32. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; **20**: 319–25.

33. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, ve ark. De Novo CIAS1 Mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID). *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 3340–48.

34. Daniel LK. Intermittent and periodic arthritic syndromes. Editor: Kopman JK. Arthritis and Allied Conditions, A textbook of Rheumatology, 13.ed. Williams and Wilkins Comp. 1997: 1279-1306

35. Akarsu AN, Saatci U, Ozen S, Bakaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genetic* 1997; **34**: 573-78.

36. Rawashded M.O., Majeed H. A. Familial Mediterranean fever in Arab children: the high prevalence and gene frequency. *Eur J Pediatr* 1996; **155**: 540-44.

37. Daniel L. Kastner. Familial Mediterranean Fever: The Genetics of Inflammation. <http://www.hosprract.com/index.htm>, 1998

38. Sneh E, Pras M, Michaeli D, Shanin N, Gafni J. Protracted arthritis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Rehabil* 1977; **16**: 100-106.

39. Sood R, Blake T, Aksentijevich I, Wood G, Chen X, Gardner D, ve ark. Construction of a 1-Mb Restriction-mapped cosmid contig containing the candidate

region for the familial Mediterranean fever locus (MEFV) on chromosome 16p13.3. *Genomics* 1997; **42**: 83-95.

40. Akar N, Misiroglu M, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N, Tumer N, ve ark. MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial Mediterranean fever. *Human Mutat* 2000; **15**: 118-19.

41. Akar N, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N. MEFV Mutation Analysis in Turkish FMF Patient with amyloidosis. *Amyloid* 1999 ; **6**: 301-02.

42. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, ve ark. Familial Mediterranean fever at the millenium. Clinical spectrum, ancient mutations, an a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health: *Medicine* 1998 ;**77** : 268-97.

43. Chen X, Fischel-Ghodsian N, Cercek A, Hamon M, Ogur G, Lotan R, ve ark. Assessment of pirin gene mutations in Turks with familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mutat* 1998; **11**: 456-60.

44. Akar N, Misiroglu M, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N, Tumer N, ve ark. MEFV mutations in Turkish patients suffering from Familial Mediterranean Fever. *Hum Mutat*. 2000 ;**15**:118-9.

45. Cattan D, Notarnicola C, Molinari N, Touitou I. Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with familial Mediterranean fever. *Lancet* 2000; **355**: 378–9.

46. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soy Turk M, ve ark. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *Q J Med* 2000; **93**:217–21.

47. Nakamura A, Yazaki M, Tokuda T, Hattori T, Ikeda S. A Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with compound heterozygosity for pyrin variant E148Q/M694I. *Intern Med* 2005; **44**: 261-5

48. Aypar E, Ozen S, Okur H, Kutluk T, Besbas N, Bakkaloglu A. Th1 polarization in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 2003; **30**: 2011–13.

49. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1972; **287**: 1302.

50. Notarnicola C, Manna R, Rey J M, . Human Mutation. Mutation and Polymorphism Report 2000;190.

51. Shohat M, Danon YL, Rotter JI. Familial Mediterranean fever: analysis of inheritance and current linkage data. *Am J Med Gene* 1992; **15**:183-8.

52. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soyuturk M, ve ark. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 2000; **93**: 217-21.

53. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol.* 2006 ;**6**:183-95.

54. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, Kastner DL. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1{beta} production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 **103**:9982-7.

55. Joost P. H, Drenth M. D, Van Der Meer J. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001; **345**: 4.

56 Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, ve ark. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000; **95**: 3223-31.

57. Staub, E., Dahl, E. & Rosenthal, A. The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins. *Trends Biochem. Sci.* 2001; **26**: 83–85.

58. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, ve ark. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC)modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;**276**:39320-9.

59. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons.*Science.* 2001 Feb 16;**291**:1279-84.

60. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature.* 1996;**384**:638-41.

61. Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L, ve ark. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*. 1998 ;**392**:941-5.
62. Chou JJ, Matsuo H, Duan H, Wagner G. Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*. 1998 ;**94**:171-80.
63. Torok M, Etkin LD. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation*. 2001 ;**67**:63-71.
64. O'Connor W Jr, Harton JA, Zhu X, Linhoff MW, Ting JP. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol*. 2003 ;**171**:6329-33.
65. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, ve ark. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease(NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum*. 2002 ;**46**:3340-8.
66. Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Certain S, Cortis E, ve ark. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet*. 2002 ;**71**:198-203.
67. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol*. 2003 ;**24**:652-8.
68. Stehlik C, Reed JC. The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation. *J Exp Med*. 2004 Sep 6;**200**(5):551-8.
69. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 1999.
70. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol*. 2000 ;**53**:55-63.
71. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;**322**:1536-38.

72. Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S: Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**: 9123-9128.

73. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 ; **326**:1-16.

74. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; **60**:422-9.

75. Druilhe A, Srinivasula SM, Razmara M, Ahmad M, Alnemri ES. Regulation of IL-1 β generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. *Cell Death Differ*. 2001; **8**:649-57.

76. Lee SH, Stehlik C, Reed JC. Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. *J Biol Chem*. 2001; **276**:34495-500.

77. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*. 2004; **117**:561-74.

78. Boatright KM, Salvesen GS. Caspase activation. *Biochem Soc Symp*. 2003; **70**:233-42.

79. Hofmann K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci*. 1999; **55**:1113-28.

80. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997; **90**:405-13.

81. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. 2003; **3**:371-82.

82. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem*. 2001; **276**:4812-8.

83. Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet.* 2000;**26**:267-8.
84. Damiano JS, Stehlik C, Pio F, Godzik A, Reed JC. CLAN, a novel human CED-4-like gene. *Genomics.* 2001;**75**:77-83.
85. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006 **9**;440:228-32.
86. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006 ;**440**:237-41.
87. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; **440**: 233-6.
88. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 ;**86**:5227-31.
89. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell.* 1993 ;**75**:653-60.
90. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghorri N, Falkow S, Zychlinsky A. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ;**96**:2396-401.
91. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1992 ;**256**:97-100.
92. Inemri ES, Fernandes-Alnemri T, Litwack G. Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities. *J Biol Chem.* 1995 ;**270**:4312-7.
- 93- Feng Q, Li P, Leung PC, Auersperg N. Caspase-1zeta, a new splice variant of the caspase-1 gene. *Genomics.* 2004 ;**84**:587-91.

94. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1995 ;**267**:2000-3.
95. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood*. 1998 ;**91**:2118-25.
96. Norman J, Yang J, Fink G, Carter G, Ku G, Denham W, Livingston D. Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE). *J Interferon Cytokine Res*. 1997 ;**17**:113-8.
97. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N (eds). *Essentials of Clinical Immunology* (4th ed). Oxford, Blackwell Science Ltd, 1999: 1-31.
98. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In : Stites DP, Terr AI, editor *Basic and Clinical Immunology* 1994:105- 123.
99. Dinarello CA. Interleukin -1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N Engl J Med* 1984; **311**: 1413-1418.
100. Nororiha IL, Niemir Z. Stein H, Waldher R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 775-786.
101. Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology* Philadelphia. WB Saunders Company. 1994 ; 240-261
102. Mulero JJ, Pace AM, Nelken ST, Loeb DB, Correa TR, Drmanac R, Ford JE. IL1HY1: A novel interleukin-1 receptor antagonist gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 ;**263**:702-6.
103. Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, et al. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics*. 2000 ;**66**:213-6.
104. Watanabe N, Kawaguchi M, Kobayashi Y. Activation of interleukin-1beta-converting enzyme by nigericin is independent of apoptosis. *Cytokine*. 1998 ;**10**:645-53.

105 Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, ve ark. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 ;**96**:6261-6.

106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/geneprod.fcgi?geneid=3553>

107. Kozak W, Kluger MJ, Soszynski D, Conn CA, Rudolph K, Leon LR, Zheng H. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 ;**856**:33-47.

108. Masumoto J, Taniguchi S, Sagara J. Pyrin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ;**280**:652-5.

109. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 ;**276**:39320-9.

110. Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, ve ark. ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 ;**293**:1314-8.

111. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, ve ark. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004;**430**: 213–218.

112. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, ve ark. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1999 ;**274**:33835-8.

113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/geneprod.fcgi?geneid=29108>

114. Chae, J.J., H.D. Komarow, J. Cheng, G. Wood, N. Raben, P.P. Liu, ve ark. Targeted disruption of Pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol. Cell*. 2003 ;**11**: 591–604.

115. Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S, ve ark. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ*. 2006 ;**13**:236-49.

116. Gang N, Drenth JP, Langevitz P, Zemer D, Breznia N, Pras M, ve ark. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol*. 1999 ;**26**:890-7.

117. Diaz A, Hu C, Kastner DL, Schaner P, Reginato AM, Richards N, Gumucio DL. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 2004 ;**50**:3679-89

118. Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, Cho JY, Nayar J, Mueller JL, ve ark. Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet*. 2004 ;**364**:1779-85.

119. Yokoyama T, Sagara J, Guan X, Masumoto J, Takeoka M, Komiyama ve ark. Methylation of ASC/TMS1, a proapoptotic gene responsible for activating procaspase-1, in human colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2003 ;**202**:101-8.

FORMLAR

Gönüllülerin Bilgilendirme ve Olur (Rıza) Formu

Bugün sizden Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığına neden olan MEFV genindeki mutasyonların hastalığa nasıl yol açtığını ve tedavide kullandığımız ilaçların bu genin davranışlarına nasıl etki ettiğini araştırmak amacıyla bir kan örneği vermeniz istenmektedir.

Ailevi Akdeniz ateşi ve bununla ilişkili veya benzer otoinflatuar hastalıklarda yapılacak olan bilimsel çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla vereceğiniz kan örneği ve bu örnekten elde edilecek serum, DNA ve RNA İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı laboratuvarlarında saklanacak ve gerekli izinler alınmak koşuluyla bu konuda çalışma yapmak isteyen bilim adamlarının kullanımına açık tutulacaktır.

Sizden alınmış olan kan örneği, araştırma amacıyla başka bir laboratuara yollandığında, örneğin sizden alındığını gösterir herhangi bir kişisel bilgi içermeyecektir. Yapılacak bilimsel çalışmalar genellikle çok sayıda örnekle yürütülecek, ve bu çalışmalardan toplu sonuçlar çıkacaktır. Bu nedenle, çalışmaların kısa vadedeki sonuçlarından kişisel olarak sizin veya ailenizin diğer bireylerinin yararlanması söz konusu olmayabilir. Bununla beraber, vereceğiniz kan örnekleri sayesinde, bu hastalığın tam olarak anlaşılmasını, yeni tedavi ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacak çalışmaların yapılabilmesi mümkün olacaktır.

Bağışladığınız bu kan örneğiyle, çalışmaların sonuçlarından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için de herhangi bir ücret ödemeniz de gerekmemektedir.

Bu araştırmaya yaklaşık 100 kişinin katılması beklenmektedir. Araştırma için kan vermenizin sizin için herhangi bir yan etkisi yoktur. Kan vermeden önce her zaman almakta olduğunuz ilaçları kesmeniz gerekmemektedir.

Kan örneği verip vermemek konusunda özgürsünüz. Bu çalışmalara katılmayı ve kan vermeyi kabul etmeseniz de, bu merkezde yürütülen tedavinizde herhangi bir aksama olamayacaktır.

Yürümekte olan çalışmaların genel sonuçları hakkında Dr Ahmet Gül'den bilgi alabilir ve herhangi bir soru veya sorun olduğu takdirde bu doktora 0212 6318699 telefon numaralarından ulaşabilirsiniz.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kan vermeyi kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı:

İmzası:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisinin:

Adı-Soyadı:

İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı:

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:/...../.....

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 12/10/2005

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon

Toplantı Sayısı : 10

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz İç Hastalıkları, Romatoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ahmet Gül'ün, üstlendiği ve Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Aris Çakris'in yürüteceği 2005/1446 protokol numaralı "Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)'ne bağlı inflamatuvar ataklarda ASC, CASP1 ve IL1B genlerinin ekspresyonunun incelenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması kurulumuzda incelendi, araştırma fonundan desteklendiği takdirde, etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. Aykan CANBERK

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Beyhan ÖMER

Biyokimya A.D

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Mübâccel DEMİRKOL

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Selim BADUR

Mikrobiyoloji ve Kli.Mik. A.D

Prof.Dr. Veli UYSAL

Patoloji A.D

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aris	Soyadı	Çakiris
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	27/08/1980
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	21959183750
Email	cikiris@yahoo.com	Tel	0212 4142000-33318

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi ,Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Fener Rum Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	iyi	iyi	62,50	
Yunanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	-	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	54,356	54,560	54,764
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ustek, D., Bektas, M., **Cakiris, A.**, Oku, B. and Bermek, E .: Homo sapiens elongation factor 2 mRNA, complete cds. [AY942181](#). Homo sapiens elon...[gi:60685055]

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Bilardo, sinema , gezi